

SPEZIFISCHE HERZGLYKOSIDREZEPTOREN

**Bindungsstudien mit ^3H -g-Strophanthin
an verschiedenen Organen und Zellmembranen
der Ratte und des Meerschweinchens**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München**

Gunter Philipp

1980

1981

Aus der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern

Direktor: Professor Dr. med. G. Riecker

SPEZIFISCHE HERZGLYKOSIDREZEPTOREN

Bindungsstudien mit ^3H -g-Strophanthin
an verschiedenen Organen und Zellmembranen
der Ratte und des Meerschweinchens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

GUNTER PHILIPP
aus München

1980

aus der Universitäts-Bibliothek
des Universitäts-Bibliothekars
Kleinmann
Bibliothek: Professor Dr. med. H. W. W. W.

EXHIBITION OF THE
UNIVERSITY OF LEIDEN
IN THE
UNIVERSITY OF LEIDEN
IN THE
UNIVERSITY OF LEIDEN



UNIVERSITY OF LEIDEN
IN THE
UNIVERSITY OF LEIDEN
IN THE
UNIVERSITY OF LEIDEN

UNIVERSITY OF LEIDEN
IN THE
UNIVERSITY OF LEIDEN

1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. E. Erdmann

Mitberichterstatter: .. Prof. Dr. G. Riecker

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 1981

EINLEITUNG

1.1. Der Herzglykosidrezeptor und das $(Na^+ + K^+)$ -ATPase System	6
1.2. Ziele dieser Arbeit	10

METHODIK

2.1. Materialien	11
2.2. Pharmakodynamische Untersuchungen an isolierten Zellmembranen	
2.2.1. Präparation der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase enthaltenden Zellmembranen	11
2.2.1.1. Herz	11
2.2.1.2. Niere	13
2.2.1.3. Hirn	14
2.2.1.4. Skelettmuskel	15
2.2.1.5. Erythrocyten	17
2.2.2. Messungen der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität	
2.2.2.1. Prinzip der Aktivitätsbestimmung	17
2.2.2.2. Hemmung der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase durch g-Strophanthin	20
2.2.2.3. Hemmung der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase durch g-Strophanthin nach Vorinkubation	21
2.2.2.4. Zeitabhängiger Verlauf der Aktivität	22
2.2.3. Messungen der Bindung von 3H -g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor isolierter Zellmembranen	
2.2.3.1. Zeitabhängige Bindung: Assoziation des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes	22
2.2.3.2. Konzentrationsabhängige Bindung: Scatchard-plot	23
2.2.3.3. Aufbereitung der Proben und Meßverfahren	24
2.2.3.3.1. Zentrifugenverfahren	24
2.2.3.3.2. Filterverfahren	24
2.2.3.4. Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal vorhandenen 3H -g-Strophanthins	25
2.2.3.5. Definition der unspezifischen Bindung	26

2.2.4. Messungen der Dissoziation des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes	27
2.2.4.1. Isolierung des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes	27
2.2.4.2. Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes durch	28
2.2.4.2.1. Verdrängung des ^3H -g-Strophanthins durch nicht markiertes g-Strophanthin	28
2.2.4.2.2. Verdünnung	29
2.3. Pharmakodynamische Untersuchungen an schlagenden Ventrikelstreifen aus Rattenherzen	30
2.3.1. Messungen der Kontraktionskraft	
2.3.1.1. Präparation der Ventrikelstreifen	30
2.3.1.2. Messung der Kontraktionskraft nach Einwirkung von g-Strophanthin	30
2.3.1.3. Bestimmung des Feuchtgewichtes	31
2.3.2. Messungen der Bindung von ^3H -g-Strophanthin an schlagende Ventrikelstreifen	32
2.3.2.1. Inkubation mit ^3H -g-Strophanthin und Inkubationszeit	32
2.3.2.2. Messung der gebundenen Radioaktivität	32
2.3.2.3. Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal vorhandenen ^3H -g-Strophanthins	33
2.3.2.4. Definition der unspezifischen Bindung	33
2.3.3. Aufnahmekinetik von $^{86}\text{Rb}^+$ in schlagende Ventrikelstreifen	34
2.3.3.1. Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal vorhandenen $^{86}\text{Rb}^+$	35
2.3.4. Änderung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in schlagende Ventrikelstreifen unter Einwirkung von g-Strophanthin	35
2.3.5. Messung des Inulinraumes in schlagenden Ventrikelstreifen	36

3. ERGEBNISSE

3.1. Spezifische und unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen	37
3.1.1. Zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen	39
3.1.2. Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen und Bindungskapazität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$	42
3.1.3. Reversibilität der g-Strophanthin-Bindung an den Herzglykosidrezeptor und Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten	50
3.1.3.1. Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Bindung	51
3.1.3.2. Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung	51
3.1.3.3. Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes	53
3.1.3.4. Thermodynamische Eigenschaften der g-Strophanthin-Bindung an den Herzglykosidrezeptor	55
3.1.3.4.1. Aktivierungsenergie der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$	56
3.1.3.4.2. Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstanten	57
3.1.3.5. Negative Cooperativität	64
3.2. Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität und g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung	70
3.3. g-Strophanthin-Effekt und ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung	75
3.3.1. Effekt von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter schlagender Ventrikelstreifen des Rattenherzens	75
3.3.2. Bindung von ^3H -g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor schlagender Ventrikelstreifen und schlagender Skelettmuskelstreifen	76

3.4. Effekt von g-Strophanthin auf den transmembranösen Ionentransport in schlagenden Ventrikelstreifen	79
3.4.1. Aufnahmekinetik von $^{86}\text{Rb}^+$ in schlagende Ventrikelstreifen aus Rattenherzen	79
3.4.2. Intrazelluläre Aufnahme von ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$) unter g-Strophanthin	80
4. DISKUSSION	142
5. ZUSAMMENFASSUNG	157
6. LITERATURVERZEICHNIS	162
7. LEBENSLAUF	175

1. EINLEITUNG

1.1. der Herzglykosidrezeptor und das $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-System

Auf der Suche nach dem Wirkungsmechanismus und dem primären Angriffspunkt der Herzglykoside ist große Mühe darauf verwandt worden, eine Beeinflussung des zellulären Metabolismus durch Herzglykoside nachzuweisen.

Nachdem man erkannt hatte, daß mit einem durch Herzglykoside bewirkten positiv inotropen Effekt auch regelmäßig eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums verbunden ist (Langer, 1972; Langer, 1977; Langer, 1980), wurden vor allem jene Zellbestandteile untersucht, die das freie intrazelluläre Kalzium beeinflussen oder die selbst durch Kalzium beeinflusst werden:

- das sarkoplasmatische Retikulum
- die Zellmembran
- die Mitochondrien und
- die kontraktilen Proteine

Als nachgewiesen werden konnte, daß intrazellulär applizierte Herzglykoside wirkungslos sind (Caldwell und Keynes, 1959; Glynn, 1962), konzentrierten sich die Untersuchungen besonders auf die Aussenseite der Zellmembran.

Schatzmann (1953) entdeckte in der Erythrocytenmembran ein Enzymsystem für den aktiven Transport von Natrium und Kalium und fand gleichzeitig, daß dieser Ionentransport über die Zellmembran spezifisch durch Herzglykoside gehemmt werden kann. 1957 isolierte Skou aus einer Fraktion Zellmembranen aus Nervenfasern von Krebsen ein durch Na^+ und K^+ aktivierbares, ATP-spaltendes Enzym und vermutete, damit auch das biochemische Äquivalent der Natriumpumpe gefunden zu haben (Skou, 1957; Skou, 1965).

Als einzige sichere Wirkung der Herzglykoside konnte bis heute trotz einer Vielzahl von untersuchten Zellbestandteilen lediglich eine allerdings hochspezifische Hemmung des aktiven transmembranösen Natrium- und Kaliumtransportes der Zelle gemessen

werden. Dieser aktive Kationentransport gegen einen elektrochemischen Gradienten wird von einem membrangebundenen Enzymsystem, der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase katalysiert (Skou, 1973; Schwartz et al., 1975).

Die primäre Bindung eines Herzglykosids erfolgt sehr wahrscheinlich an ein die Zellwand durchspannendes Bindungsprotein. Auf der Außenseite der Membran wird das Herzglykosid gebunden, wodurch die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbare ATPase auf der Innenseite des Bindungsproteins (auf der Innenseite der Membran) gehemmt wird. Diese Interaktion zwischen Herzglykosid und Bindungsprotein führt zu einer Konformationsänderung der Membran und stellt den ersten Schritt in der Kette der Ereignisse dar, die letztlich zum positiv inotropen Effekt führen (Kyte, 1972; Glynn und Karlish, 1975; Schwartz et al., 1975; Schwartz, 1976a; Erdmann, 1978; Akerä und Brody, 1978).

1964 konnte Repke zeigen, daß die Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase bei verschiedenen Spezies durch unterschiedliche Herzglykosidkonzentrationen erfolgt, entsprechend der jeweils unterschiedlichen Glykosidempfindlichkeit. Die unterschiedliche Glykosidempfindlichkeit der verschiedenen Spezies korrelierte mit der Hemmbarkeit der Enzymaktivität der aus den verschiedenen Organen extrahierbaren $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase, so daß die Unterschiede in der Glykosidempfindlichkeit durch die mit jeweils unterschiedlicher Affinität erfolgende Komplexbildung zwischen Herzglykosidmolekül und $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbarer ATPase erklärt werden kann (Repke et al., 1965; Dransfeld et al., 1966; Besch et al., 1970; Borsch-Galetke et al., 1972; Ku et al., 1974). Diese Befunde sind mehrfach bestätigt worden und führten zu der Hypothese, die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbare ATPase sei der Herzglykosidrezeptor (Repke und Portius, 1963; Repke, 1964; Glynn, 1964; Matsui und Schwartz, 1968; Langer, 1972; Akerä et al., 1973; Erdmann und Schoner, 1973; Ku et al., 1974; Godfraind, 1975; Schwartz, 1976b; Akerä et al., 1976; Akerä, 1977).

An isolierten menschlichen Herzmuskelzellmembranen und Zellmembranen aus Rinderhirn konnte schließlich nachgewiesen werden, daß die Bindung von radioaktiv markiertem g-Strophanthin an

den Herzglykosidrezeptor eine Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbaren ATPase nach sich zieht und daß die unter exakt identischen Bedingungen gemessene Rezeptorbindung eine Hemmung des Enzyms von gleichem Ausmaß bedingt (Erdmann und Schoner, 1974; Erdmann et al., 1976a), d.h. wenn 50% der Herzglykosidrezeptoren mit g-Strophanthin besetzt sind, ist gleichzeitig die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbare ATPase zu 50% gehemmt.

Die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbare ATPase, dieses Leitenzym von Zellmembranen (Skou, 1957; Nakao, 1975), findet sich in hoher Aktivität in all jenen Organen, in denen der physiologische Erregungsablauf der Zelle zur Änderung der Ionenpermeabilität der Membran für Natrium und Kalium führt oder die mit Sekretion und/oder Resorption dieser Kationen befaßt sind. So ist die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbare ATPase in hoher Konzentration in Herz, Niere, Nervengewebe und Muskulatur gefunden worden (Skou, 1957; Repke und Portius, 1963; Skou, 1973; Erdmann und Schoner, 1973; Dahl und Hokin, 1974; Jørgensen, 1975; Glynn und Karlish, 1975; Whittam und Chipperfield, 1975). Da Herzglykoside die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbare ATPase hemmen (und damit den transmembranösen Transport von Natrium und Kalium), läßt sich die Rezeptorkinetik zweckmäßigerweise am besten untersuchen an isolierten, angereicherten Zellmembranpräparationen aus solchen Organen mit hoher ATPase-Aktivität, zumal die unspezifische (die nicht mit diesem Enzym korrelierte) Glykosidbindung an solchen Zellmembranen gering ist und durch die Präparation insgesamt eine hohe Rezeptorkonzentration (Anreicherungsfaktor etwa 20 bis 50) erreicht wird. Bei Versuchen mit isolierten Zellmembranen darf allerdings nicht vergessen werden, daß in diesen Membranpräparationen Zell- und Organintegrität aufgehoben sind und auch gerade bei Präparationsschritten mit Desoxicholat sogar Membranbestandteile wie Proteine und Lipide herausgelöst werden können.

Wenn die membrangebundene ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbare ATPase das Herzglykosidrezeptorprotein darstellt, dann sollten entsprechende Rezeptoren (wenn auch mit eventuell anderen Rezeptoreigenschaften) auch an relativ digitalisresistenten Spezies wie Ratte (Detweiler, 1967; Borsch-Galetke et al., 1972) und

Meerschweinchen nachweisbar sein. Es müßte sich auch bei diesen Spezies zeigen lassen, daß die Bindung des Herzglykosids an das Bindungsprotein einer Sättigungskinetik gehorcht und reversibel ist, daß die Bindung zeit- und temperaturabhängig erfolgt und mit einem reproduzierbaren Effekt (Hemmung der ATPase) verknüpft ist, der mit der pharmakologischen Wirksamkeit (Steigerung der Kontraktionskraft) korreliert. Dabei wird erwartet, daß die Bindung des Herzglykosids an den Rezeptor bei diesen relativ digitalis-resistenten Spezies mit geringerer Affinität erfolgt und daß zur Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase höhere Herzglykosidkonzentrationen nötig sind als bei den empfindlichen Spezies. Es wäre aber auch denkbar, daß in den einzelnen Organen nur wenige Bindungsstellen gefunden werden, daß die Herzglykosid-Bindungsstelle nicht mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase gekoppelt ist oder daß das Ausmaß der Bindung nicht übereinstimmt mit dem pharmakologischen Effekt der Herzglykoside.

Wenn an einem einzigen Beispiel gezeigt werden könnte, daß das Ausmaß der Herzglykosidbindung nicht mit der Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität oder dem pharmakologischen Effekt korreliert, dann wäre die vermutete Kausalbeziehung (Schwartz et al., 1975; Godfraind, 1975; Schwartz, 1976; Akera et al., 1976; Erdmann, 1977; Brody und Akera, 1977; Akera, 1977; Temma et al., 1978; Huang et al., 1979):

Herzglykosid-Rezeptorbindung



Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase



Zunahme der Kontraktionskraft

ernstlich in Frage gestellt.

1.2. Ziele dieser Arbeit

Mit den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden

- 1) ob sich überhaupt spezifische Herzglykosidrezeptoren in den Organen der als relativ digitalisresistent geltenden Spezies Ratte und Meerschweinchen finden lassen,
- 2) ob die Eigenschaften dieser Rezeptoren in beiden Spezies an allen Organen die gleichen sind,
- 3) ob sich eine quantitative Übereinstimmung finden läßt zwischen der Bindung des Herzglykosids an den Herzglykosidrezeptor und dem pharmakologischen Effekt, der Zunahme der Kontraktionskraft,
- 4) inwieweit der Rezeptor mit der $(Na^{+}+K^{+})$ -aktivierbaren ATPase gekoppelt ist.

Die Untersuchungen an der Ratte sind deshalb von besonderer Bedeutung, weil sowohl die Arbeitsgruppe von Schwartz (Allen und Schwartz, 1969) als auch die von Akera (Akera et al., 1972) publiziert haben, daß eine spezifische Glykosidbindung an Rattenherzmembranen nicht reproduzierbar möglich sei. Es lag deshalb nahe, die relative Digitalisresistenz der Ratte mit dem angeblichen Fehlen von Herzglykosid-Rezeptoren in Verbindung zu bringen. Kürzlich ist allerdings eine Mitteilung über eine quantifizierbare, spezifische Glykosid-Rezeptorbindung am Ratten-Herz erschienen (Sharma und Banerjee, 1978; siehe auch Clausen und Hansen, 1974 und 1977 für Ratten-Skelettmuskel; Choi und Akera, 1977 für Ratten-Hirn; Lin und Akera, 1978 für Ratten-Skelettmuskel, -Niere und -Hirn).

2. METHODIK

2.1. Materialien

^3H -g-Strophanthin (^3H -Ouabain) mit einer spezifischen Radioaktivität von 12 - 16 Ci/mMol wurde von New England Nuclear, 6072-Dreieich bezogen. Als Szintillationslösungen wurden für wässrige Proben Insta-Gel und Unisolve und für nicht wässrige Proben Insta-Fluor verwendet. Zum Auflösen von Organproben wurde Soluene-350 benützt.

Insta-Gel, Insta-Fluor und Soluene-350 wurden von Fa. Packard Instruments GmbH, Frankfurt bezogen; Unisolve von Fa. Zinsser, Frankfurt.

Alle anderen Chemikalien und verwendeten Testenzyme waren von analytischer Reinheit und stammten von E. Merck, Darmstadt oder von Boehringer, Mannheim.

Als Versuchstiere dienten Ratten (Sprague-Dawley, weiblich, 150 - 250 g Gewicht) und Meerschweinchen (bunt, weiblich, etwa 300 g Gewicht).

Zur Tierfütterung wurde Altromin-Ratten-Standard-Diät und Altromin-Meerschweinchen-Standard-Diät verwendet (Fa. Altromin, Lage-Lippe); Fütterung und Leitungswasser ad libitum.

2.2. Pharmakodynamische Untersuchungen an isolierten Zellmembranen

2.2.1. Präparation der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase enthaltenden Zellmembranen

2.2.1.1. Herz

Die Herzen von etwa 20 jungen Tieren (zusammen ca. 15 g Feuchtwicht) wurden rasch entnommen (jeweils nach kurzer Narkose mit Äthyläther und anschließender Dekapitation) und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -40°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt zur Membranpräparation wieder aufgetaut.

Die Herzen wurden dann in einem auf 0°C vorgekühlten Mixer (Braun-Melsungen) 2 min lang in 100 ml vorgekühlter Saccharose-EDTA-Lösung (Saccharose 0.25 M, EDTA 1 mM, Imidazol ad pH 7.0) bei Höchstgeschwindigkeit zerkleinert. Nach dem Homogenisieren in einem Glas-Teflon-Potter (Braun-Melsungen; Eiswasserkühlung, 10 Stöße mit dem Homogenisierstab) wurde das Homogenat mit Saccharose-EDTA-Lösung (Saccharose 0.25 M, EDTA 1 mM, pH 7.0) auf 200 ml aufgefüllt und unter Rühren innerhalb einer Minute mit 15 ml Natriumdesoxicholat-Lösung (wässrig) 5% versetzt, 30 min lang unter Eiskühlung bei 0°C gerührt und anschließend 30 min lang bei 10 500 Upm (Sorvall RC-5, Rotor SS 34) abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 44 000 Upm 30 min lang zentrifugiert (Beckman L-5 50, Rotor 60 Ti). Das Sediment wurde in 10 ml gekühlter EDTA-Lösung (EDTA 1 mM, Imidazol ad pH 7.0) homogenisiert, mit 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 auf 40 ml aufgefüllt und über Nacht bei -40°C eingefroren.

Nach dem raschen Auftauen (Wasserbad bei Zimmertemperatur) und erneutem Homogenisieren wurden unter Rühren und Eiskühlung 60 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 und 0.75 ml 0.1 M Magnesiumchlorid-Lösung hinzugefügt. Nach Zugabe von 15 ml täglich frisch bereiteter 6 M Natriumjodidlösung (Zugabe tropfenweise innerhalb einer Minute) wurde 5 min lang bei 0°C gerührt. Danach wurden 120 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 zugesetzt und das Homogenat 30 min lang bei 44 000 Upm abzentrifugiert (Beckman L-5 50, Rotor 60 Ti).

Das Sediment wurde homogenisiert, mit 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 auf 200 ml aufgefüllt und erneut 30 min lang bei 44 000 Upm zentrifugiert (Beckman L-5 50, Rotor 60 Ti). Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Für die Bindungsexperimente wurde das Sediment dann letztlich in 40 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 6.5 homogenisiert und bei 4°C aufbewahrt.

Die $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase-Aktivität der Zellmembranpräparation wurde im optisch-enzymatisch-gekoppelten Test nach Schoner et al. (1967, siehe 2.2.2.1.) gemessen. Das Protein wurde nach Lowry et al. (1951) ermittelt mit Rinderalbumin (Behringwerke, Marburg) als Standard. Die spezifische Aktivität des Herz-Zellmembran-homogenates betrug 0.1 - 1.0 U/mg Protein. Mehr als 90% der Gesamt-ATPase-Aktivität (in der Regel 95 - 98%) wurden durch 10^{-3} M g-Strophanthin gehemmt.

2.2.1.2. Niere

Die Nieren von etwa 10 jungen Tieren (zusammen ca. 20 - 30 g Feuchtgewicht) wurden entnommen (jeweils nach kurzer Narkose mit Aethyläther und anschließender Dekapitation), von der bindegewebigen Kapsel befreit und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -40°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut.

Danach wurden die Nieren in einem auf 0°C vorgekühlten Mixer (Braun-Melsungen) 2 min lang in 80 ml vorgekühlter Saccharose-EDTA-Lösung (Saccharose 0.25 M, EDTA 1 mM, Imidazol ad pH 7.0) bei Höchstgeschwindigkeit zerkleinert. Anschließend wurde die Suspension mit einem Glas-Teflon-Potter (Braun-Melsungen; Eiswasserkühlung, 10 Stöße mit dem Homogenisierstab) homogenisiert, mit Saccharose-EDTA-Lösung (Saccharose 0.25 M, EDTA 1 mM, pH 7.0) auf 120 ml aufgefüllt und 10 min lang bei 6000 Upm (Sorvall RC 5 Rotor SS 34) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und in Eis aufbewahrt. Das Sediment wurde erneut in Saccharose-EDTA-Lösung homogenisiert, auf 120 ml aufgefüllt und noch einmal 10 min lang bei 6000 Upm abzentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurden die beiden Überstände vereinigt und 30 min lang bei 14 000 Upm (Sorvall RC 5, Rotor SS 34) abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgegossen und verworfen; das Sediment wurde in Saccharose-EDTA-Lösung (Saccharose 0.25 M, EDTA 1 mM, pH 7.0) homogenisiert, auf 200 ml aufgefüllt und 30 min lang bei 14 000 Upm (Sorvall RC 5, Rotor SS 34) zentrifugiert. Der Überstand wurde nach vorsichtigem Dekantieren verworfen.

Das Sediment eines jeden Rotor-Gefäßes wurde dann 1 - 2 mal mit etwa 2 ml Harnstoff-Lösung (Harnstoff 2 M, Ammoniumsulfat 6 mM, EDTA 2 mM, Magnesiumchlorid 0.1 M, Imidazol ad pH 7.0) beträufelt. Durch vorsichtiges Drehen und Wenden des Gefäßes wurde die obere gelbliche Schicht abgelöst.

Die vereinigten Lösungsmittel wurden mit Harnstoff-Lösung auf 60 ml aufgefüllt, homogenisiert und mit 100 ml 10 mM Imidazol-Lösung pH 6.5 versetzt und anschließend 30 min lang bei 18 500 Upm (Sorvall RC 5, Rotor SS 34) abzentrifugiert. Das Sediment

wurde homogenisiert, mit 10 ml Imidazol-Lösung pH 6.5 auf 100 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 0.75 ml 0.1 M Magnesiumchlorid-Lösung und 15 ml frisch bereiteter 6 M Natriumjodid-Lösung (tropfenweise innerhalb einer Minute) unter Eiskühlung 5 min lang bei 0°C gerührt. Danach wurden sofort 120 ml 10 mM Imidazol-Lösung pH 6.5 hinzugefügt und 30 min lang bei 18 500 Upm abzentrifugiert (Sorvall RC 5, Rotor SS 34). Das Sediment wurde erneut homogenisiert und insgesamt noch dreimal mit jeweils 200 ml 10 mM Imidazol-Lösung pH 6.5 gewaschen.

Das Sediment wurde schließlich in 40 ml 10 mM Imidazol-Lösung pH 6.5 homogenisiert und mit 0.1 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 6.5 versetzt und kühl aufbewahrt.

Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität der Zellmembranpräparation wurde im optisch-enzymatisch-gekoppelten Test nach Schoner et al. (1967, siehe 2.2.2.1.) gemessen. Das Protein wurde nach Lowry et al. (1951) ermittelt mit Rinderalbumin als Standard. Die spezifische Aktivität des Nieren-Zellmembran-Homogenates betrug 0.6 - 3.8 U/mg Protein. Mehr als 90% der Gesamt-ATPase-Aktivität (in der Regel zwischen 92 und 95%) wurden durch 10^{-3} M g-Strophanthin gehemmt.

2.2.1.3. Hirn

Die Hirne von 10 jungen Tieren (Feuchtgewicht ca. 15 g) wurden entnommen (jeweils nach kurzer Narkose mit Äthyläther und anschließender Dekapitation) und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -40°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut.

Danach wurden die Hirne in einem auf 0°C vorgekühlten Mixer (Braun-Melsungen) 2 min lang in 100 ml vorgekühlter Saccharose-EDTA-Lösung (Saccharose 0.25 M, EDTA 1 mM, Imidazol ad pH 7.0) bei Höchstgeschwindigkeit zerkleinert. Nach dem Homogenisieren mit einem Glas-Teflon-Potter (Braun-Melsungen; Eiswasserkühlung, 10 Stöße mit dem Homogenisierstab) wurde das Homogenat mit vorgekühlter Saccharose-EDTA-Lösung auf 240 ml aufgefüllt und 30 min lang bei 10 000 Upm (Sorvall RC 5, Rotor SS 34) abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 40 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0

homogenisiert und über Nacht bei -40°C eingefroren.

Nach dem raschen Auftauen (Wasserbad bei Zimmertemperatur) und erneutem Homogenisieren wurden unter Rühren und Eiskühlung 60 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 und 0.75 ml 0.1 M Magnesiumchlorid-Lösung hinzugefügt. Nach Zugabe von 15 ml frisch bereiteter 6 M Natriumjodid-Lösung (tropfenweise innerhalb einer Minute) wurde 5 min lang bei 0°C gerührt. Danach wurden 120 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 hinzugefügt und das Homogenat 30 min lang bei 20 000 Upm (Sorvall RC 5, Rotor SS 34) abzentrifugiert. Das Sediment wurde erneut homogenisiert und insgesamt noch dreimal mit jeweils 200 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 gewaschen. Das Sediment wurde letztlich in 40 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 7.2 homogenisiert und kühl aufbewahrt.

Die $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase-Aktivität der Zellmembranpräparation wurde im optisch-enzymatisch-gekoppelten Test nach Schoner et al. (1967, siehe 2.2.2.1.) gemessen. Das Protein wurde nach Lowry et al. (1951) ermittelt mit Rinderalbumin als Standard. Die spezifische Aktivität des Hirn-Zellmembran-Homogenates betrug 0.6 - 1.1 U/mg Protein. Etwa 90% der Gesamt-ATPase-Aktivität wurden durch 10^{-3} M g-Strophanthin gehemmt.

2.2.1.4. Skelettmuskel

Versuche an der Skelettmuskulatur der Ratte werden häufig am Musculus soleus durchgeführt (Kohn und Clausen, 1971; Clausen und Hansen, 1974; Clausen und Hansen, 1977; Clausen und Kohn, 1977). Der Musculus soleus allein liefert aber für eine gute Membranpräparation nicht genügend Ausgangsgewebe (man bräuchte die Muskeln zu vieler Tiere). Es wurde deshalb die gesamte Unterschenkelmuskulatur der Hinterpfote verwendet (siehe Abb. 1). Die Muskulatur von 10 jungen Tieren (Feuchtgewicht etwa 50 g) wurde herausgeschnitten (jeweils nach kurzer Narkose mit Äthyläther und rascher Dekapitation), von den Sehnenansätzen weitgehend befreit und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -40°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut.

Danach wurde die Muskulatur in einem auf 0°C vorgekühlten Mixer (Braun-Melsungen) in 150 ml gekühlter Saccharose-EDTA-Lösung (Saccharose 0.25 M, EDTA 1 mM, Imidazol ad pH 7.0) 2 min lang bei Höchstgeschwindigkeit zerkleinert, auf 280 ml aufgefüllt und durch ein grobmaschiges Koliertuch abgepreßt.

Nach dem Homogenisieren mit einem Glas-Teflon-Potter (Braun-Melsungen; Eiswasserkühlung, 10 Stöße mit dem Homogenisierstab) wurde das Homogenat unter Eiskühlung und Rühren mit 20 ml Natriumdesoxicholat-Lösung 5% (Zugabe tropfenweise innerhalb einer Minute) versetzt und 30 min lang gerührt. Danach wurde 30 min lang bei 8 100 Upm abzentrifugiert (Sorvall RC 5, Rotor SS 34) und das Sediment verworfen.

Der Überstand wurde 30 min lang bei 44 000 Upm (Beckman L-5 50, Rotor 60 Ti) abzentrifugiert. Das Sediment wurde homogenisiert in 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0, auf 40 ml aufgefüllt und über Nacht bei -40°C eingefroren.

Nach dem raschen Auftauen (Wasserbad bei Zimmertemperatur) wurde erneut homogenisiert und mit 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 auf 90 ml aufgefüllt, unter Rühren und Eiskühlung mit 0.75 ml 0.1 M Magnesiumchlorid-Lösung und 10 ml frisch hergestellter 6 M Natriumjodid-Lösung (Zugabe tropfenweise innerhalb einer Minute) versetzt und 10 min lang gerührt. Sofort anschließend wurde das Homogenat mit 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 auf 200 ml aufgefüllt und 30 min lang bei 45 000 Upm (Beckman L-5 50, Rotor 60 Ti) abzentrifugiert. Das Sediment wurde erneut homogenisiert und insgesamt noch dreimal mit jeweils 200 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 7.0 gewaschen. Das Sediment wurde letztlich in 40 ml 1 mM EDTA-Lösung pH 7.2 homogenisiert und kühl aufbewahrt.

Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität der Zellmembranpräparation wurde im optisch-enzymatisch-gekoppelten Test nach Schoner et al. (1967, siehe 2.2.2.1.) gemessen. Das Protein wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt mit Rinderalbumin als Standard. Die spezifische Aktivität des Skelettmuskel-Zellmembran-Homogenates betrug etwa 0.1 - 0.4 U/mg Protein. Zwischen 85 und 90% der Gesamt-ATPase-Aktivität wurden durch 10^{-3} M g-Strophanthin gehemmt.

2.2.1.5. Erythrocyten

Nach kurzer Narkose mit Aethyläther und rascher Dekapitation wurden etwa 20 ml Blut (5 - 10 junge Tiere) aufgefangen (Becherglas mit einem Tropfen Heparin).

Dem Blut wurden nach genauer Volumenbestimmung 120 ml destilliertes Wasser von 0°C hinzugefügt. Unter Eiskühlung wurde die Erythrocyten-Suspension dann 10 min lang gerührt und anschließend 30 min lang bei 20 000 Upm (Sorvall RC 5, Rotor SS 34) abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in Pufferlösung (0.1 M Imidazol/HCl pH 7.3 und 1 mM EDTA pH 7.3) homogenisiert, mit der gleichen Pufferlösung auf 150 ml aufgefüllt und erneut 30 min lang bei 20 000 Upm (Sorvall RC 5, Rotor SS 34) abzentrifugiert.

Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Für die Bindungsexperimente wurde das Sediment dann letztlich in 0.01 M Imidazol/HCl pH 7.3 homogenisiert und auf exakt das gleiche Blut-Ausgangsvolumen aufgefüllt.

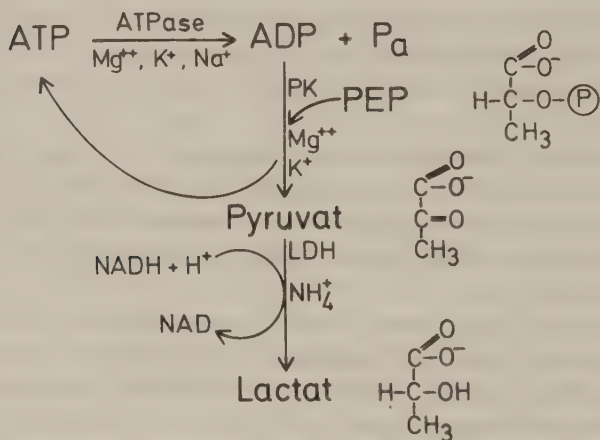
Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität dieser Zellmembran-Präparation war so gering, daß sie sich im optisch-enzymatisch-gekoppelten Test nach Schoner et al. (1967) nicht sicher reproduzierbar messen ließ.

2.2.2. Messungen der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität

2.2.2.1. Prinzip der Aktivitätsbestimmung

Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase spaltet ATP hydrolytisch in ADP und anorganisches Phosphat P_a . In einer ersten Folgereaktion wird das entstehende ADP bei Zusatz von Phosphoenolpyruvat (PEP) durch Pyruvatkinase (PK) wieder im Verhältnis 1:1 phosphoryliert; gleichzeitig entsteht Pyruvat. Dieses Pyruvat wird in der Reaktionskette durch Laktatdehydrogenase (LDH) mit Hilfe von zugesetztem Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid- H_2 ($\text{NADH} + \text{H}^+$) im Verhältnis 1:1 zu Milchsäure reduziert.

Aufgrund der bestehenden stöchiometrischen Beziehung zwischen der Oxidation des $\text{NADH} + \text{H}^+$ und der Hydrolyse von ATP kann die ATPase-Aktivität eines Zellmembranhomogenates direkt aus der Abnahme der Extinktion bei 334 nm (NADH) ermittelt werden.



$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\Delta E / \text{min} \times V}{\epsilon \times v} (\text{U})$$

V = Gesamtvolumen (ml)
 v = zugegebene Enzymmenge (ml)
 ϵ = Extinktionskoeffizient 6,18 (cm²/μMol)

Die Aktivitätsmessung erfolgte bei 37°C kontinuierlich in einem Eppendorf-Photometer 1101 M mit Hilfe eines Eppendorf-Kompensationsschreibers 6511. Die Küvetten hatten eine Innenweite von 1 cm.

Die ATPase-Testlösung enthielt folgende Substanzen:

66.6 mM Imidazol, 100 mM NaCl, 66.6 mM Ammoniumchlorid, 3.3 mM Magnesiumchlorid, 3.3 mM ATP-Na₂, 1.6 mM PEP, 0.3 mM NADH+H⁺ sowie 6 U Pyruvatkinase (Originalsuspension Boehringer, Mannheim) und 6 U Laktatdehydrogenase (Originalsuspension Boehringer, Mannheim). Das pH wurde mit Salzsäure auf pH 7.25 (pH 6.5) eingestellt.

Aktivitätsmessungen und Bestimmungen der Affinität bei den verschiedenen Organen der beiden Spezies ergaben, daß bei den meisten Organen die höchste Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase und die höchste Affinität des Herzglykosidrezeptors zum *g*-Strophanthin etwa bei pH 6.5 oder 6.75 gegeben ist (siehe Abb. 13). Deshalb wurde meistens ein solches vom physiologischen pH-Wert abweichendes pH verwendet und bei den verschiedenen Versuchen auch jeweils angegeben. Kontrollversuche bei pH-Werten von 7.25 ergaben bis auf eine etwas geringere Enzymaktivität (bis 10%) und eine etwas geringere *g*-Strophanthin-Rezeptor-Affinität (bis etwa 20%) keine abweichenden Ergebnisse im Vergleich zu den Versuchen mit niedrigeren pH-Werten.

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde die Reaktionskette mit einer kleinen Menge des Zellmembran-Homogenates gestartet (pro Küvette 1.5 ml ATPase-Testlösung, sofern nichts anderes angegeben wurde). Die zugegebene Menge Zellmembran-Homogenat wurde so bemessen, daß die Abnahme der Extinktion etwa 0.2/min betrug.

Als unspezifische nicht $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität wurde jener Anteil der ATPase ermittelt, der sich durch 10^{-3} M *g*-Strophanthin nicht hemmen ließ. Die Differenz beider Messungen wurde als spezifische $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität bezeichnet.

Eine Enzymeinheit U ist definiert als der Umsatz von 1 μmol ATP pro Minute bei 37°C. Protein wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt; als Standard wurde eine 5%ige Rinderalbumin-Lösung verwendet.

2.2.2.2. Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase durch g-Strophanthin

Zur Bestimmung der halbmaximalen Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase durch g-Strophanthin (ohne Vorinkubation) wurde eine kleine Menge Zellmembranen im optisch-enzymatisch-gekoppelten Test nach Schoner et al. (1967, siehe 2.2.2.1.) bei 37°C mit steigenden Konzentrationen an g-Strophanthin inkubiert.

Beispiel: 1.57 ml ATPase-Testlösung pH 7.25 (pH 6.5)
 0.05 ml Zellmembran-Homogenat
 0.18 ml g-Strophanthin-Lösung 10^{-4} M

Unter fortlaufender Registrierung der Extinktion wurde durch Zugabe der Zellmembranen die Enzymreaktion gestartet. Nach wenigen Minuten wurde dann g-Strophanthin in der zu untersuchenden Endkonzentration hinzugefügt. Die der jeweiligen g-Strophanthin-Endkonzentration entsprechende maximale Hemmung der ATPase-Aktivität der zugegebenen Zellmembranen wurde bei den verwendeten g-Strophanthin-Konzentrationen (10^{-8} M bis 10^{-3} M) nach spätestens 2 min erreicht. Dieses Äquilibrium der Hemmung wurde der Auswertung zugrundegelegt. Der Aktivitätsverlauf insgesamt wurde kontinuierlich über mindestens 20 min verfolgt und registriert.

Die Gesamtaktivität an aktivierbarer ATPase wurde ermittelt durch Zugabe von 0.18 ml Wasser an Stelle von g-Strophanthin. Als nicht $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase wurde jener Anteil an der ATPase-Aktivität bestimmt, der sich durch 10^{-3} M g-Strophanthin-Endkonzentration nicht hemmen ließ. Die Differenz beider Messungen wurde als spezifische, durch g-Strophanthin hemmbare $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität bezeichnet.

2.2.2.3. Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase durch g-Strophanthin nach Vorinkubation

Eine entsprechend große Menge Zellmembranen wurde bei 37°C (Reagenzglas in einem Schüttel-Wasserbad) in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Imidazol/ PO_4 pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Magnesiumchlorid und der geforderten g-Strophanthin-Konzentration inkubiert.

Beispiel: 0.10 ml Imidazol/HCl 1 M pH 7.25 (pH 6.5)
 0.06 ml Imidazol/ PO_4 0.1 M pH 7.25 (pH 6.5)
 0.06 ml Magnesiumchlorid 0.1 M
 0.20 ml Strophanthin 0.01 M
 1.08 ml Wasser
 0.50 ml Zellmembran-Homogenat

Die erforderliche, jeweils spezie- und organspezifisch variierende Inkubationszeit bei 37°C wurde zuvor durch eine zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die jeweiligen Zellmembranen ermittelt (siehe 2.2.3.1.). Als Äquilibrium der Bindung und damit als erforderliche Inkubationszeit wurde der dort ermittelte Zeitpunkt des Maximums der Bindung bezeichnet. Von diesem Inkubat wurden nach Ablauf der Inkubationszeit rasch 0.3 - 1.0 ml bei 37°C in den optisch-enzymatisch-gekoppelten Test nach Schoner et al. (1967, siehe 2.2.2.1.) eingebracht, wobei die ATPase-Testlösung zusätzlich die dem Inkubat entsprechende g-Strophanthin-Konzentration enthielt.

Beispiel: 1.35 ml ATPase-Testlösung pH 7.25 (pH 6.5)
 0.15 ml g-Strophanthin 0.01 M
 0.50 ml Inkubat mit g-Strophanthin 10^{-3} M

Der Verlauf der Hemmungskurve wurde kontinuierlich bis zu 10 min lang verfolgt und registriert. Gemessen wurde die Anfangsaktivität des zugesetzten Zellmembran-Inkubates. Dazu wurde an die Verlaufskurve nach einer Verlaufsstrecke von etwa einer Minute eine Tangente angezeichnet und die Extinktionsabnahme $\Delta E/\text{min}$ aus der Steigung der Tangente errechnet. Die im weiteren Verlauf der Kurve nach 2 - 3 min regelmäßig zu beobachtende Reaktivierung des Enzyms (Abdissoziation des g-Strophanthins) bleibt dabei außer Betracht.

Durch Inkubation einer aliquoten Menge Wasser an Stelle von

g-Strophanthin und anschließender Einbringung in den optisch-enzymatisch-gekoppelten Test wurde die Gesamtaktivität an aktivierbarer ATPase ermittelt.

Als unspezifische, nicht ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase wurde jener Anteil an der Gesamtaktivität gemessen, der sich durch 10^{-3} M *g*-Strophanthin nicht hemmen ließ. Die Differenz beider Werte wurde als spezifische ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbare-ATPase-Aktivität bezeichnet.

2.2.2.4. Zeitabhängiger Verlauf der Aktivität

In einem Reagenzglas wurde bei 37°C (Schüttelwasserbad) eine entsprechende Menge Zellmembran-Homogenat mit 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Imidazol/ PO_4 pH 7.25 (pH 6.5) und 3 mM Magnesiumchlorid inkubiert.

Beispiel: 0.5 ml Imidazol/HCl 1 M pH 7.25 (pH 6.5)
0.3 ml Imidazol/ PO_4 0.1 M pH 7.25 (pH 6.5)
0.3 ml Magnesiumchlorid 0.1 M
7.9 ml Aqua dest.
1.0 ml Zellmembran-Homogenat

Aus diesem Inkubat wurde zu den angegebenen Zeiten jeweils eine kleine Menge entnommen (zum Beispiel 0.2 ml) und in den optisch-enzymatisch-gekoppelten Test nach Schoner et al. (1967, siehe 2.2.2.1.) eingebracht. Der Anteil der spezifischen ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase an der Gesamtaktivität wurde durch Hemmung mit 10^{-3} M *g*-Strophanthin ermittelt.

2.2.3. Messungen der Bindung von ^3H -*g*-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor isolierter Zellmembranen

2.2.3.1. Zeitabhängige Bindung:

Assoziation des *g*-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes

In Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen (Fassungsvermögen 10 ml; Fa. Christ, Osterode/Harz) wurde eine kleine Menge Membran-Homogenat (zwischen 0.04 und 1.5 mg Membranprotein) bei der jeweils erforderlichen Temperatur in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Imidazol/ PO_4 pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Magnesiumchlorid und 4 - 11 nM ^3H -*g*-Strophanthin inkubiert.

Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 2.0 ml.

Beispiel: 0.10 ml Imidazol/HCl 1 M pH 7.25 (pH 6.5)
 0.06 ml Imidazol/ PO_4 0.1 M pH 7.25 (pH 6.5)
 0.06 ml Magnesiumchlorid 0.1 M
 0.01 ml ^3H -g-Strophanthin 8×10^{-7} M
 1.57 ml Aqua dest.
 0.20 ml Zellmembran-Homogenat

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Zellmembran-Homogenates gestartet und zu den angegebenen Zeiten gestoppt durch Zugabe von 1 ml eisgekühlter 10^{-2} M g-Strophanthin-Lösung und rasches Abfiltrieren über Glasfaserfiltern (Whatman GF/C) oder durch Zugabe von 1 ml eisgekühlter 10^{-2} M g-Strophanthin-Lösung und weiteres Abkühlen des Reaktionsgemisches in Eiswasser und sofortige Zentrifugation (beide Verfahren siehe 2.2.3.3.). Die Radioaktivität auf dem Filter oder im Sediment wurde gemessen.

2.2.3.2. Konzentrationsabhängige Bindung

Eine kleine Menge Zellmembran-Homogenat (Membranprotein zwischen 0.04 und 1.5 mg) wurden in Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen (siehe 2.2.3.1.) bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Imidazol/ PO_4 pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Magnesiumchlorid, 4 - 11 nM ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (10^{-9} M bis 10^{-3} M) nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins inkubiert. Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 2.0 ml.

Beispiel: 0.10 ml Imidazol/HCl 1 M pH 7.25 (pH 6.5)
 0.06 ml Imidazol/ PO_4 0.1 M pH 7.25 (pH 6.5)
 0.06 ml Magnesiumchlorid 0.1 M
 0.01 ml ^3H -g-Strophanthin 8×10^{-7} M
 0.10 ml g-Strophanthin 10^{-6} M
 1.47 ml Aqua dest.
 0.20 ml Zellmembran-Homogenat

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Zellmembran-Homogenates gestartet und wie unter 2.2.3.3. angegeben nach Ablauf der Inkubationszeit gestoppt. Die erforderliche, jeweils spezies- und organspezifisch variierende Inkubationszeit wurde zuvor durch eine zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen des betreffenden Membran-Homogenates ermittelt (siehe 2.2.3.1.). Als Äquilibrium der Bindung und damit als erforderliche Inkubationszeit wurde der dort gefundene Zeitpunkt des Maximums der Bindung bezeichnet.

2.2.3.3. Aufbereitung der Proben und Meßverfahren

Der Herzglykosidrezeptor ist membrangebunden; deshalb ist es möglich, das an den Herzglykosidrezeptor auf den Membranen gebundene ^3H -g-Strophanthin durch Abzentrifugieren oder durch Abfiltrieren von nicht membrangebundenem ^3H -g-Strophanthin zu trennen.

2.2.3.3.1. Zentrifugation und weitere Behandlung

Nach Zugabe von 1 ml eisgekühlter 10^{-2} M g-Strophanthin-Lösung und raschem Abkühlen des Reaktionsansatzes in Eiswasser wurde das Protein im Reaktionsgefäß bei 0°C 30 min lang bei 33 000 Upm (Beckman L-5 50, Rotor 50 Ti) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert; noch an der Gefäßwand anhaftende Reste des Reaktionsansatzes wurden vorsichtig möglichst vollständig und sorgfältigst mit einem Saugpapier aufgenommen. Das Sediment wurde in 0.25 ml 1 M NaOH-Lösung bei 80°C (Schüttelwasserbad) gelöst, mit 2 Tropfen rauchender Salzsäure annähernd neutralisiert, in das Szintillationszählgefäß eingebracht und mit 10 ml Szintillationszählflüssigkeit (Insta-Gel, Fa. Packard) über-gossen.

Die Radioaktivität wurde in Szintillationszählgeräten in cpm gemessen (Packard Tri-carb 2660 oder BF Betasint 5000) und mit Hilfe einer jeweils ebenso erstellten Eichkurve quantifiziert (in der Regel als Picomole ^3H -g-Strophanthin).

2.2.3.3.2. Filterverfahren und weitere Behandlung

Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 1 ml eisgekühlter 10^{-2} M g-Strophanthin-Lösung und Vollfüllen des Reaktionsgefäßes mit auf Eiswassertemperatur gekühltem destilliertem Wasser und rasches Abfiltrieren (Glasfaserfilter Whatman GF/C, Nutsche mit dem Sog einer Wasserstrahlpumpe). Um alle Flüssigkeitsreste mit zu erfassen, wurde das Reaktionsgefäß noch einmal mit destilliertem Wasser vollgefüllt und über das Glasfaserfilter entleert.

Die gesammelten Filterscheiben eines Versuches wurden zusammen auf Glasplatten in einem Trockenschrank 30 min lang bei 90°C getrocknet, anschließend sofort mit einer Pinzette in die Szintillationszählgefäße gelegt und mit 10 ml Szintillationszählflüssigkeit (Insta-Fluor, Fa. Packard) übergossen. Die auf den Filtern gebundene Radioaktivität wurde wie unter 2.2.3.3.1. angegeben gemessen.

Das Filterverfahren eignete sich besonders für geringe Proteinmengen im Reaktionsansatz. Dabei wurde beachtet, bei diesem Verfahren möglichst nur so viel Membranprotein im Reaktionsansatz einzusetzen, daß sich das abfiltrierte Protein auf dem Filter in dünnster Schicht niederschlagen kann.

Bei Beachtung dieses Umstandes wurden mit beiden Verfahren grundsätzlich gleiche Ergebnisse erhalten. Eine meßbare, durch g-Strophanthin verdrängbare Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Glasfaserfilter in Abwesenheit von nativem Zellmembran-Protein konnte nicht gemessen werden.

2.2.3.4. Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal vorhandenen ^3H -g-Strophanthins

Bei Versuchen, in denen die ablaufende Reaktion durch rasches Abkühlen in 10^{-3} M g-Strophanthin und Eiswasser und sofortige Zentrifugation gestoppt worden war, wurde eine aliquote Menge Zellmembran-Homogenat mit destilliertem Wasser auf 2.0 ml aufgefüllt und wie unter 2.2.3.3. beschrieben abzentrifugiert und weiter verarbeitet. In das Szintillationszählgefäß wurde dann 1/10 des ursprünglichen Reaktionsansatzes (ohne Zellmembran-Homogenat, also z.B. 0.18 ml) einpipettiert und die Radioaktivität im Szintillationszählgerät gemessen und das Ergebnis mit dem Faktor 10 entsprechend multipliziert.

Beim Filterverfahren wurde ein Reaktionsgefäß mit einer aliquoten Menge Zellmembran-Homogenat und mit destilliertem Wasser vollgefüllt und abfiltriert. Das mit dem Membranprotein beladene Filter wurde wie unter 2.2.3.3. beschrieben weiter behandelt. Nach dem Trocknen und Abkühlen des Filters wurde ein Aliquot des ursprünglichen Reaktionsansatzes mit einer Eppendorf-Pipette

auf das Filter aufgebracht. Das Filter wurde erneut 30 min lang bei 90°C getrocknet, anschließend mit 10 ml Szintillationszählflüssigkeit übergossen und die Radioaktivität im Szintillationszählgerät gemessen.

Die Eichwerte wurden jeweils in Dreifachbestimmungen angesetzt und das Ergebnis gemittelt.

2.2.3.5. Definition der unspezifischen Bindung

Die jeweilige Bindungsreaktion wurde unter identischen Bedingungen mit der gleichen Menge Zellmembran-Homogenat in Gegenwart von zusätzlich 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins gestartet. Gestoppt wurde die Reaktion zu den jeweils angegebenen Zeiten in üblicher Weise wie unter 2.2.3.3. beschrieben.

Völlig übereinstimmende Werte für die unspezifische Bindung wurden erhalten, wenn unter identischen Versuchsbedingungen die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an hitze-denaturierte Zellmembranen (Denaturierung der Membranen bei 80°C über 60 min) oder an mit 1 N Natronlauge denaturierte Zellmembranen gemessen wurde. Aufgrund der Übereinstimmung wurde (sofern bei den besprochenen Versuchen nichts anderes angegeben worden ist) die unspezifische Bindung stets in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins ermittelt.

Beispiel: 0.10 ml Imidazol/HCl 1 M pH 7.25 (pH 6.5)
 0.06 ml Imidazol/ PO_4 0.1 M pH 7.25 (pH 6.5)
 0.06 ml Magnesiumchlorid 0.1 M
 0.01 ml ^3H -g-Strophanthin 8×10^{-7} M
 1.37 ml destilliertes Wasser und

a) 0.20 ml Strophanthin 10^{-2} M
 0.20 ml natives Zellmembran-Homogenat

oder b) 0.20 ml destilliertes Wasser
 0.20 ml hitze-denaturierte Membranen

oder c) 0.20 ml destilliertes Wasser
 0.20 ml NaOH-denaturierte Membranen

Die unspezifische Bindung im Zentrifugen-Verfahren betrug regelmäßig weniger als 5% der Gesamtradioaktivität (mit Ausnahme der Versuche an Meerschweinchen-Erythrocyten: 60%). Im Filterverfahren wurde die unspezifische Bindung regelmäßig zwischen 1 und 3% der gemessenen Gesamtradioaktivität bestimmt (Ausnahme Ratten-Nieren-Membranen: 15 - 25%).

2.2.4. Messungen der Dissoziation des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes

2.2.4.1. Isolierung des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes

Eine größere Menge Zellmembranen (10 - 40 mg Membranprotein) wurde wie unter 2.2.3.1. angegeben bei 37°C in einem Reagenzglas (Schüttelwasserbad) inkubiert.

Beispiel: 0.5 ml Imidazol/HCl 1 M pH 7.25 (pH 6.5)
0.3 ml Imidazol/ PO_4 0.1 M pH 7.25 (pH 6.5)
0.3 ml Magnesiumchlorid 0.1 M
0.1 ml ^3H -g-Strophanthin 8×10^{-7} M
3.8 ml Aqua dest.
5.0 ml Zellmembran-Homogenat

Die erforderliche Inkubationszeit wurde wie unter 2.2.3.1. angegeben ermittelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt durch schnelles Abzentrifugieren des ^3H -g-Strophanthin-Membran-Komplexes während 30 min bei 33000 Upm (0°C , Beckman L5-50, Rotor 50 Ti). Der das nicht gebundene ^3H -g-Strophanthin enthaltende Überstand wurde abgegossen. An der Gefäßwand noch anhaftende Flüssigkeit wurde sorgfältig mit einem Saugpapier abgewischt. Danach wurde das Sediment in einem vorgekühlten Glas-Teflon-Potter (Braun-Melsungen; Eiswasserkühlung, 5 Stöße mit dem Homogenisierstab) in wenigen ml 0.1 M Imidazol/HCl pH 7.25 (pH 6.5) homogenisiert. Dieses Homogenat enthielt jetzt nur noch membrangebundenes ^3H -g-Strophanthin.

2.2.4.2. Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes

Zur Messung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet.

2.2.4.2.1. Verdrängung des ^3H -g-Strophanthins durch nicht markiertes g-Strophanthin

0.5 - 1 mg des oben unter 2.2.4.1. präparierten ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes wurden in entsprechend temperierten Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen (Fa. Christ, Osterode/Harz) mit 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Imidazol/ PO_4 pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Magnesiumchlorid und 10^{-3} M g-Strophanthin (nicht radioaktiv markiert) bei der jeweils geforderten Temperatur inkubiert.

Beispiel: 0.10 ml Imidazol/HCl 1 M pH 7.25 (pH 6.5)
0.06 ml Imidazol/ PO_4 0.1 M pH 7.25 (pH 6.5)
0.06 ml Magnesiumchlorid 0.1 M
0.20 ml g-Strophanthin 0.01 M
1.48 ml Aqua dest.
0.10 ml ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex-Homogenat

Zu den jeweils angegebenen Zeiten wurde die Verdrängung des ^3H -g-Strophanthins von seinem Membranrezeptor durch das nicht markierte g-Strophanthin gestoppt. Dazu wurde das Inkubationsröhrchen rasch mit auf 0°C heruntergekühltem destilliertem Wasser vollgefüllt und das Reaktionsgemisch sofort abfiltriert (Glasfaserfilter Whatman GF/C). Die Messung des noch membran-gebundenen ^3H -g-Strophanthins erfolgte wie unter 2.2.3.3. beschrieben.

Das maximal gebundene ^3H -g-Strophanthin wurde bestimmt durch Zugabe des aliquoten Volumens an ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex-Homogenat zum entsprechend temperierten Reaktionsansatz und sofortige Filtration ohne Inkubation.

Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde das Reaktionsgemisch zusammen mit 10^{-3} M nicht markiertem g-Strophanthin fünf Stunden lang bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit war das überhaupt abdissoziierbare ^3H -g-Strophanthin regelmäßig durch nicht markiertes g-Strophanthin ersetzt. Die nach dieser Zeit bei 37°C noch meßbare ^3H -g-Strophanthin-Membranbindung wurde als unspezifische Bindung bezeichnet und vom Maximalwert subtrahiert.

2.2.4.2.2. Dissoziation durch Verdünnung 1:100

Das aliquote Volumen mit 0.5 - 1 mg des unter 2.2.4.1. präparierten ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes wurde durch Einbringen in 50 ml Imidazol/HCl pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Imidazol/ PO_4 pH 7.25 (pH 6.5), 3 mM Magnesiumchlorid in entsprechend temperierten Reagenzgläsern 1:100 verdünnt und inkubiert.

Beispiel: 0.5 ml Imidazol/HCl 1 M pH 7.25 (pH 6.5)
0.3 ml Imidazol/ PO_4 0.1 M pH 7.25 (pH 6.5)
0.3 ml Magnesiumchlorid 0.1 M
8.8 ml destilliertes Wasser
0.1 ml ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex-Homogenat

Das Abdissoziieren des ^3H -g-Strophanthins von seinem Membran-Rezeptor wurde zu den angegebenen Zeiten durch rasches Abfiltrieren nach 2.2.3.3. gestoppt.

Das maximal gebundene ^3H -g-Strophanthin und die unspezifische Restbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde unter Einhaltung der 1:100-Verdünnung wie unter 2.2.4.2.1. beschrieben bestimmt.

2.3. Pharmakodynamische Untersuchungen an schlagenden Ventrikelstreifen aus Rattenherzen

2.3.1. Messungen der Kontraktionskraft

2.3.1.1. Präparation der Ventrikelstreifen

Die Herzen junger Ratten wurden jeweils nach kurzer Narkose mit Aethyläther und rascher Dekapitation entnommen. Gefäßreste und Vorhöfe wurden reseziert und jeweils die Ventrikelwand des rechten Ventrikels unter einer Präparierlupe bei Zimmertemperatur in einer kontinuierlich mit Carbogen (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid) durchgasten Lösung in dünne Streifen geschnitten.

Die Badlösung enthielt 149.1 mM Na^+ , 5.4 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{++} , 1.05 mM Mg^{++} , 144.1 mM Cl^- , 11.9 mM HCO_3^- , 0.42 mM H_2PO_4^- und 10 mM Glucose; das pH war 7.4.

Es wurde darauf geachtet, die Ventrikelwand nach der Kontraktionsrichtung des Ventrikels und dem Faserverlauf folgend in möglichst parallele dünne Streifen zu schneiden. Die Streifen waren maximal 1 mm dick und breit, etwa 10 mm lang und wogen zwischen 15 und 20 mg (Bestimmung des Feuchtgewichtes nach 2.3.1.3.).

2.3.1.2. Messung der Kontraktionskraft nach Einwirkung von g-Strophanthin

Sofort nach der Präparation wurden die Ventrikelstreifen jeweils an einem Ende eines Kunststoffstabes zwischen Platin-Reizelektroden befestigt und in eine konstant mit Carbogen (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid) begaste Glaskammer mit der oben beschriebenen Inkubationslösung von 35°C eingetaucht.

Das noch freie Ende des Ventrikelstreifens wurde dann an einem induktiven Kraftaufnehmer (W. Fleck, Mainz) befestigt. Nach Anlegen einer Vorspannung von 0.4 - 0.5 g wurden die Ventrikelstreifen durch Rechteckimpulse elektrisch stimuliert (Reizgerät Grass SD 19, Frequenz 1 Hz, Reizdauer 5 msec, Reizstromstärke

10 - 20% überschwellig). Die entwickelte Spannung wurde mit dem induktiven Kraftaufnehmer über einen Hellige-Vorverstärker (Hellige TF 19) auf einen Hellige-5-Kanalschreiber übertragen. Die einer Kontraktion vorausgehende maximale Spannungsentwicklung wurde an der Spitze der Spannungskurve isometrisch gemessen (technische Einzelheiten siehe Meinertz et al. 1976).

Während der Äquilibrierungsphase (etwa 60 min lang) wurde das Inkubationsmedium (50 ml) alle 20 min erneuert. Sowohl durch vorsichtige Korrektur und Erhöhung der Vorspannung als auch durch schrittweise Erhöhung der Reizstromstärke wurde die maximal mögliche Kontraktionskraft des Ventrikelstreifens erreicht.

Nach Einstellung des Äquilibrium wurde die Badlösung rasch gegen jenes Inkubationsmedium ausgetauscht, das zusätzlich noch die gewünschte g-Strophanthin-Konzentration enthielt. Der Kurvenverlauf der entwickelten Spannung im Ventrikelstreifen wurde über mindestens eine Stunde kontinuierlich aufgezeichnet. Ein Ventrikelstreifen wurde lediglich für eine Strophanthin-Konzentration verwendet.

2.3.1.3. Bestimmung des Feuchtgewichtes

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die elektrische Stimulation gestoppt, der Ventrikelstreifen vorsichtig aus den Reizelektroden herausgenommen, unter Saugpapier drei Minuten lang zwischen zwei Glasplatten abgetrocknet und anschließend gewogen (mg Feuchtgewicht).

2.3.2. Bindung von ^3H -g-Strophanthin an schlagende Ventrikelstreifen

2.3.2.1. Inkubation mit ^3H -g-Strophanthin und Inkubationszeit

Die Ventrikelstreifen wurden nach 2.3.1.1. präpariert und in der dort angegebenen Tyrodelösung bei 35°C äquilibriert. Nachdem Äquilibrium erreicht worden war, wurde die Badlösung rasch ersetzt durch jenes Inkubationsmedium, das zusätzlich die gewünschte Konzentration an ^3H -g-Strophanthin/g-Strophanthin enthielt.

Beispiel: 149.1 mM Na^+ , 5.4 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{++} , 1.05 mM Mg^{++} ,
144.1 mM Cl^- , 11.9 mM HCO_3^- , 0.42 mM H_2PO_4^- ,
10 mM Glucose, ^3H -g-Strophanthin 4×10^{-9} M,
g-Strophanthin 10^{-6} M. Inkubationsvolumen 50.0 ml.

Die erforderliche Inkubationszeit bei den einzelnen g-Strophanthin-Konzentrationen wurde den Verlaufskurven mit dem zeitabhängigen Effekt von steigenden Konzentrationen g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft schlagender Ventrikelstreifen (2.3.1.2.) entnommen. Als Inkubationszeit hier wurde der Zeitpunkt des Maximums des Effektes bei den entsprechenden g-Strophanthin-Konzentrationen in jenen Kurven gewählt.

2.3.2.2. Messung der gebundenen Radioaktivität

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ventrikelstreifen vorsichtig von den Reizelektroden abgenommen, 3 min lang zwischen Glasplatten und Saugpapier von anhaftender Badlösung befreit, gewogen und in Szintillationszählgefäße aus Glas eingelegt.

Zuletzt wurde die Gewebeprobe mit einem Tropfen destilliertem Wasser benetzt, in 1 ml Soluene-350 (Fa. Packard) gelöst (über Nacht bei Zimmertemperatur) und mit 10 ml Szintillationszählflüssigkeit (Insta-Gel, Fa. Packard) übergossen. Die Radioaktivität wurde in Szintillationszählgeräten gemessen (Packard Tri-carb 2660 oder BF Betaszint 5000).

2.3.2.3. Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal vorhandenen ^3H -g-Strophanthins

Zur Bestimmung des maximal im Inkubationsmedium vorhandenen ^3H -g-Strophanthins wurde jeweils ein Gewebestreifen aus dem rechten Ventrikel (Feuchtgewicht 15 - 20 mg) herausgeschnitten, abgepreßt, gewogen und in ein Szintillationsgefäß aus Glas eingelegt. An Stelle von Wasser wurde in diese Gefäße ein Bruchteil der Inkubationslösung mit $4 \times 10^{-9} \text{ M } ^3\text{H}$ -g-Strophanthin hinzugegeben. Nach dem Auflösen in 1 ml Soluene-350 (über Nacht bei Zimmertemperatur) wurden 10 ml Szintillationszählflüssigkeit (Insta-Gel, Fa. Packard) zugegeben und die Radioaktivität bestimmt und mit dem entsprechenden Faktor multipliziert.

2.3.2.4. Definition der unspezifischen Bindung

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an schlagende Ventrikelstreifen wurde durch Inkubation und Stimulation der Ventrikelstreifen unter identischen Bedingungen in Gegenwart von $4 \times 10^{-9} \text{ M } ^3\text{H}$ -g-Strophanthin und 10^{-4} M g -Strophanthin gemessen. Die unter dieser hohen g-Strophanthin-Konzentration noch meßbare ^3H -g-Strophanthin-Bindung wurde von uns als unspezifisch bezeichnet. Bei dieser hohen Konzentration (10^{-4} M) waren in den Kontraktionskurven (Abb. 52) regelmäßig die Zeichen der Glykosidintoxikation (Arrhythmie und/oder Kontraktur) zu registrieren. Außerdem ergibt sich auch aus der konzentrationsabhängigen Bindung von ^3H -g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor schlagender Ventrikelstreifen (Abb. 55), daß bei einer g-Strophanthin-Konzentration von $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ bereits etwa 90% der Herzglykosidrezeptoren mit g-Strophanthin besetzt sind. Obwohl es eher unwahrscheinlich ist, daß die ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-4} M unmarkiertem g-Strophanthin auch an spezifische Glykosidrezeptoren erfolgt, könnte dennoch eine Glykosidbindungsstelle mit extrem geringer Affinität zum g-Strophanthin existieren. Eine solche würde sich allerdings dem biochemischen Nachweis mit unserer Methodik

entziehen. In der Regel haben spezifische Pharmakon-Rezeptoren eine hohe Affinität zu den Pharmakon-Molekülen (Dissoziationskonstanten kleiner als 10^{-6} M).

2.3.3. Aufnahmekinetik von $^{86}\text{Rb}^+$ in schlagende Ventrikelstreifen aus Rattenherzen.

Die Präparation der Ventrikelstreifen und die Inkubation mit $^{86}\text{Rb}^+$ erfolgte nach 2.3.1.1. in der dort genannten Tyrodelösung bei 37°C in 50.0 ml Inkubationsvolumen.

Die Ventrikelstreifen wurden dazu aber auf kleinen Metallhäkchen über chirurgisches Nahtmaterial mit dem Kraftaufnehmer (BB Elektronik, Laichingen, BB Transducer FU-10 DC) verbunden und durch Rechteckimpulse elektrisch gereizt (Waveform-Generator Type 162, Pulse-Generator Type 161, Fa. Tektronix, Portland; Frequenz 1 Hz, Reizdauer 5 msec, Reizstromstärke 10 - 20% überschwellig). Der Verlauf der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich registriert (Schreiber: Gould 2400, Fa. Gould-Instruments, Cleveland).

Nach Erreichen des Äquilibriums wurde jeweils $1.5\text{ }\mu\text{Ci } ^{86}\text{Rb}^+$ -Lösung zugegeben (etwa 3 000 000 cpm im Inkubationsmedium).

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Ventrikelstreifen aus dem Inkubationsbad herausgenommen, von den Häkchen abgestreift, 15 sec lang mit destilliertem Wasser gespült, dann 3 min lang unter Saugpapier von anhaftender Badlösung abgetrocknet, in Szintillationszählgefäße eingelegt und genau gewogen. Anschließend wurde jeweils ein Streifen mit 1.0 ml Soluene-350 übergossen und während einer Stunde im Wasserbad bei 60°C erwärmt und aufgelöst. Nach Zugabe von 10.0 ml Unisolve wurde die Radioaktivität gemessen.

2.3.3.1. Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal vorhandenen $^{86}\text{Rb}^+$

Zur Bestimmung des maximal im Inkubationsmedium vorhandenen $^{86}\text{Rb}^+$ wurde jeweils ein Gewebestreifen aus dem rechten Ventrikel (Feuchtgewicht 10 - 20 mg) herausgeschnitten, abgepreßt und in einem Szintillationszählgefäß gewogen. Dann wurde 0.01 ml der $^{86}\text{Rb}^+$ enthaltenden Inkubationslösung hinzugegeben. Nach dem Auflösen in 0.1 ml Soluene-350 (60 min lang in einem Wasserbad bei 60°C) wurden 10.0 ml Unisolve (Fa. Zinsser) zugegeben und die Radioaktivität gemessen und mit dem Faktor 5000 multipliziert.

2.3.4. Änderung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in schlagende Ventrikelstreifen aus Rattenherzen unter der Einwirkung von g-Strophanthin

Die Ventrikelstreifen wurden wie unter 2.3.1.1. angegeben präpariert und in der dort angegebenen Tyrodelösung bei 37°C in 50.0 ml äquilibriert.

Nach Erreichen des Äquilibriums wurde die Tyrodelösung rasch gegen eine vorgewärmte und ebenfalls begaste Tyrodelösung ausgetauscht, die zusätzlich noch die angegebene g-Strophanthin-Konzentration enthielt.

Die dann folgende Inkubationsphase wurde zeitlich nach dem entsprechenden konzentrationsabhängigen Eintritt des Maximums des positiv inotropen Effektes von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft schlagender Ventrikelstreifen aus Abb. 52 bemessen. Danach wurde zum g-Strophanthin enthaltenden Inkubationsmedium 2.5 µCi einer $^{86}\text{Rb}^+$ -Lösung hinzugegeben (etwa 5 000 000 cpm in 50.0 ml Inkubationsmedium).

Nach weiteren 10 min wurden die Ventrikelstreifen dem Inkubationsbad entnommen und wie unter 2.3.3. beschrieben weiter behandelt und aufgelöst. Die enthaltene Radioaktivität wurde gemessen.

Die Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal vorhandenen $^{86}\text{Rb}^+$ erfolgte wie unter 2.3.3.1. beschrieben.

2.3.5. Messung des Inulinraumes in Ventrikelstreifen

Die Präparation der Ventrikelstreifen und die Inkubation erfolgte nach 2.3.3. in 50.0 ml der unter 2.3.1.1. genannten Tyrodelösung bei 37°C.

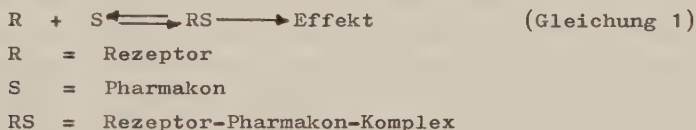
Nach Erreichen des Äquilibrium wurde jeweils 5 μCi ^{14}C -Inulin-Lösung (etwa 10 000 000 cpm im Inkubationsmedium; ^{14}C -Inulin-carboxylic-acid, spez. Aktivität 1.5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$; Amersham-Buchler, Braunschweig) zugegeben und 20 min lang inkubiert.

In einem Vorversuch wurde zuvor durch zeitabhängige Inkubation unter identischen Bedingungen das Äquilibrium der Aufnahme von ^{14}C -Inulin in Ventrikelstreifen bestimmt (Äquilibrium nach 10 min sicher erreicht; nicht gezeigt). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ventrikelstreifen aus dem Inkubationsbad herausgenommen, von den Häkchen abgestreift und ohne Beseplung mit Wasser 3 min lang unter Saugpapier von anhaftender Badlösung abgetrocknet. Auflösen der Ventrikelstreifen, Messung der Radioaktivität und Bestimmung des maximal im Inkubationsmedium vorhandenen ^{14}C -Inulin (cpm) nach 2.3.3.1.

3. ERGEBNISSE

3.1. Spezifische und unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen

Die Wechselwirkungen zwischen einem Rezeptor und einem Pharmakon werden durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben (Clark, 1935). Das gilt auch für die Bindung von g-Strophanthin an seinen Rezeptor (Baker und Willis, 1970; Hansen, 1971; Erdmann und Schoner, 1973).



Wenn diese Gleichung gilt, dann ist daraus ersichtlich, daß das Ausmaß der pharmakologischen Wirkung eines Pharmakons direkt proportional der Anzahl der von ihm besetzten Rezeptoren ist, wobei die Zahl der besetzten Rezeptoren abhängig ist von den Konzentrationen an Pharmakon und Rezeptor und der entsprechenden Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} des Pharmakon-Rezeptor-Komplexes.

Für das Äquilibrium gilt dann

$$\frac{[\text{R}] \cdot [\text{S}]}{[\text{RS}]} = K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

- $[\text{R}]$ = molare Rezeptorkonzentration
- $[\text{S}]$ = molare Pharmakonkonzentration (g-Strophanthin)
- $[\text{RS}]$ = molare Konzentration des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes
- k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
- k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
- K_D = Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes

Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit von *g*-Strophanthin wird im folgenden nur dieses Herzglykosid in seinem Bindungsverhalten an den Herzglykosidrezeptor von Ratte und Meerschweinchen untersucht, wobei angenommen werden darf, daß die bekannten Unterschiede in der Affinität der einzelnen herzwirksamen Steroide zum Herzglykosidrezeptor (Erdmann und Schoner, 1974) für entsprechende Fragestellungen gleichermaßen relevant sind.

Bei den Bindungsexperimenten mit isolierten Zellmembranen liegen Zellmembranhomogenate vor, bei denen davon ausgegangen wird, daß innerhalb der Suspension eine gleichmäßige, reproduzierbare Verteilung der Membranpartikel mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität vorliegt. Bei der Inkubation aliquoter Teile dieser Zellmembranhomogenate wird somit immer eine bestimmte gleichbleibende Anzahl an Rezeptoren inkubiert. Dies wurde anhand der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität durch enzymatische Messungen indirekt überprüft. Die Inkubation erfolgte in einer geeigneten Pufferlösung bei 37°C unter Zusatz bestimmter Mengen *g*-Strophanthin und/oder ^3H -*g*-Strophanthin.

Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung 1) entsteht bei Überschuß von *g*-Strophanthin mit zunehmender Inkubationszeit eine bestimmte Menge *g*-Strophanthin-Rezeptor-Komplex bis sich ein Äquilibrium einstellt; d.h. im Äquilibrium bleibt die Konzentration an *g*-Strophanthin-Rezeptor-Komplex konstant, da pro Zeiteinheit die gleiche Menge *g*-Strophanthin-Rezeptor-Komplex zerfällt wie durch Reaktion aus *g*-Strophanthin und Herzglykosidrezeptor entsteht. Bei diesen Reaktionsverhältnissen wird somit eine Bindungsreaktion erwartet, die einer Sättigungskinetik entspricht.

Quantitativ zu berücksichtigen ist bei der spezifischen Reaktion von ^3H -*g*-Strophanthin mit dem Herzglykosidrezeptor die unspezifische Bindung, die man erhält, wenn man (siehe 2.2.3.5.) die Membranen zusätzlich zu ^3H -*g*-Strophanthin mit einer sehr großen Menge (Endkonzentration 10^{-3} M) nicht tritium-markierten *g*-Strophanthins unter den gleichen Versuchsbedingungen inkubiert. Bei dieser *g*-Strophanthin-Konzentration besteht nur eine statistische Wahrscheinlichkeit von etwa 1 : 500 000, daß ein

tritium-markiertes g-Strophanthin-Molekül einen Herzglykosid-Rezeptor-Komplex bilden kann; praktisch sämtliche spezifischen Herzglykosidrezeptoren werden daher mit nicht markiertem g-Strophanthin abgesättigt sein. Die unter diesen Bedingungen trotzdem noch meßbare Radioaktivität (bis zu etwa 5% der Gesamtbindung; im Durchschnitt 50 cpm bei etwa 1 mg Membranprotein; Ausnahmen: Meerschweinchen- und Ratten-Erythrocyten und Ratten-Niere, siehe Abb. 4,9,10) kann erklärt werden durch Adhäsionen von ^3H -g-Strophanthin an Membranpartikeln oder am Glasfaserfilter oder durch ^3H -g-Strophanthin in Flüssigkeitsrückständen. Gleiche Werte für die unspezifische Bindung erhält man durch Inkubation von ^3H -g-Strophanthin mit durch Natronlauge oder durch Hitzeeinwirkung denaturierten Membranen. Um die spezifische Gesamtbindung an den Herzglykosidrezeptor quantitativ zu erhalten, muß die ermittelte unspezifische Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert werden.

3.1.1. Zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen

Die folgenden Abbildungen zeigen den zeitabhängigen Verlauf der Bindungskurven von ^3H -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen aus

- Abb. 2 : Meerschweinchen-Herz
- Abb. 3 : Meerschweinchen-Hirn
- Abb. 4 : Meerschweinchen-Erythrocyten
- Abb. 5 : Meerschweinchen-Nieren
- Abb. 6 : Meerschweinchen-Skelettmuskel
- Abb. 7 : Ratten-Herz
- Abb. 8 : Ratten-Hirn
- Abb. 9 : Ratten-Erythrocyten
- Abb. 10 : Ratten-Niere
- Abb. 11 : Ratten-Skelettmuskel

Durch diese Messungen läßt sich eine zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die jeweiligen Membranen reproduzierbar nachweisen. Aus den Versuchen ergeben sich jedoch keine ein-

einheitlichen Kurvenbilder. Der erwartete Kurvenverlauf einer Sättigungskinetik wurde beim Meerschweinchen nur an Herz, Hirn, Erythrocyten und Niere und bei der Ratte nur an Hirn, Niere und Erythrocyten gefunden, wobei der membrangebundene ^3H -g-Strophanthin-Rezeptorkomplex über mehrere Stunden stabil bleibt und nur sehr langsam zerfällt entsprechend dem irreversiblen Verlust an Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase.

Aber schon bei der Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Nierenmembranen (Abb. 5) fällt auf, daß die Bindung nach etwa 20 min ein Maximum durchläuft, dann wieder leicht abnimmt und erst im weiteren Verlauf über Stunden auf gleicher Höhe bleibt.

Bei den Bindungsversuchen an Membranen aus Meerschweinchen-Skelettmuskel (Abb. 6), Ratten-Herz (Abb. 7) und Ratten-Skelettmuskel (Abb. 11) zeigte sich, daß die Bindungskapazität nach kurzer Zeit ein initiales Maximum durchläuft und anschließend kontinuierlich rasch und stark abnimmt. Inkubiert man nun die gleichen Membranen bei niedrigeren Temperaturen, so geht die Bindungskapazität für ^3H -g-Strophanthin weniger schnell verloren (nicht gezeigt).

Dieser Effekt ist bei den bislang untersuchten Spezies (Untersuchungsergebnisse an Mensch, Rind, Hund, Katze, Schaf, Meerschweinchen, Ratte, Frosch, Kröte; Erdmann und Schoner, 1973; Erdmann und Hasse, 1975; Erdmann, 1978) an isolierten Membranen noch nicht beschrieben worden. Erste Hinweise auf eine Instabilität des Herzglykosid-Rezeptor-Komplexes aus g-Strophanthin und Rattenherzmembranen finden sich allerdings schon in den Arbeiten von Allen und Schwartz (1969) und Akerä et al. (1972). Der beschriebene zeitliche Verlauf dieser Bindungskinetik an isolierten Rattenherz-Membranen stimmt aber erstaunlich gut überein mit dem zeitabhängigen Verlauf der Zunahme der Kontraktionskraft perfundierter Rattenherzen durch g-Strophanthin (Fricke et al., 1975).

Um auszuschließen, daß g-Strophanthin selbst den Rezeptor verändert, wurden gleiche Mengen von Ratten-Skelettmuskelmembranen unter identischen Bedingungen 10 und 30 min lang bei 37°C ohne g-Strophanthin vorinkubiert (Abb. 12). Nach Ablauf jeweils

dieser Zeit wurde die Bindungsreaktion gestartet. Der Versuch zeigt eindeutig, daß die Eigenschaft der Membran, ^3H -g-Strophanthin spezifisch zu binden, zeitabhängig bereits während der Vorinkubation verloren geht.

Dieser zeit- und temperaturabhängige Effekt ist auch dadurch meßbar, daß man Ratten-Herzmembranen bei 37°C unter identischen Pufferbedingungen inkubiert und die Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase zeitabhängig verfolgt (Abb. 14): nach 30 min zeigt sich, daß die ATPase-Aktivität bereits um etwa 50% abgenommen hat. Ratten-Skelettmuskelmembranen zeigen das gleiche Verhalten (Abb. 15).

Durch Inkubation von Ratten-Skelettmuskel-Membranen unter den gleichen Versuchsbedingungen aber mit Zusatz von Trypsin-Inhibitor wird ein identischer Verlauf der Aktivitätskurve erhalten. Unter Zugabe von Aprotinin (Trasylol^R, Bayer-Leverkusen), eines Proteasen-Inhibitors, nimmt die ATPase-Aktivität sogar noch etwas schneller ab; insgesamt läßt sich durch diese Versuche zeigen, daß die Änderung der Affinität des Rezeptors gegenüber dem Herzglykosid offensichtlich nicht durch die Aktivität proteolytischer Enzyme bedingt ist (Abb. 16), also wahrscheinlich eine Membraneigenschaft dieser Spezies darstellt.

Zur Bestimmung der zeitabhängigen Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Erythrocyten der beiden untersuchten Spezies wurde die proteingebundene Radioaktivität bei identischen Inkubationsbedingungen nach einem anderen Verfahren gemessen. Wegen der geringen Zahl der ATPase-Moleküle läßt sich die ATPase-Aktivität selbst nicht direkt messen. Deshalb mußte sowohl beim Meerschweinchen als auch bei der Ratte eine relativ große Menge an Erythrocyten-Homogenat inkubiert werden, um überhaupt eine signifikant gebundene Radioaktivität messen zu können. Diese große Proteinmenge verstopft jedoch sofort die Filterporen, so daß zur Messung des proteingebundenen ^3H -g-Strophanthins bei Erythrocyten das Zentrifugenverfahren (siehe 2.2.3.3.1.) zur Anwendung gelangte. Dennoch betrug bei Meerschweinchen-Erythrocyten die unspezifische Bindung etwa 60% des gesamten gebundenen ^3H -g-Strophanthins (Abb. 4). Der Kurvenverlauf als solcher

weist aber einen über Stunden stabilen ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex aus.

An Ratten-Erythrocyten haben wir praktisch lediglich eine unspezifische Glykosidbindung messen können (Abb. 9), die vom gleichen Ausmaß war wie an menschlichen Erythrocyten. Auch Heller und Beck (1978) haben unter ähnlichen experimentellen Bedingungen an Ratten-Erythrocyten-Membranen lediglich eine nicht sättigbare Bindung von ^3H -g-Strophanthin nachweisen können.

Bei Schafen wurden Erythrocyten nachgewiesen (Lauf et al., 1978; Joiner und Lauf, 1978), bei denen zwischen intrazellulär und extrazellulär kein Kalium-Gradient besteht, so daß eine hohe $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität auch nicht notwendig erscheint zur Aufrechterhaltung eines Kalium/Natrium-Gradienten. Da der Herzglykosidrezeptor mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ gekoppelt ist, wäre es naheliegend anzunehmen, das Fehlen einer spezifischen Herzglykosidbindung mit dem Fehlen der Membran-ATPase zu verknüpfen. Diese Erklärungsmöglichkeit für das Nichtgelingen einer spezifischen Herzglykosidrezeptor-Bindung kann aber nicht zutreffen, da bei Ratten-Erythrocyten ein hoher intrazellulärer Kaliumgehalt (Kirk, 1977) und auch ATPase-Aktivität nachgewiesen wurde (Grobecer et al., 1963). Dementsprechend gibt der Nachweis einer extrem geringen spezifischen ^3H -g-Strophanthin-Bindung an Rattenerythrocyten eher einen Hinweis auf eine extrem niedrige Rezeptoraffinität für das Herzglykosid.

3.1.2. Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen und Bindungskapazität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$

Die Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes gilt als Maß für die Affinität zwischen g-Strophanthin und dem Herzglykosidrezeptor. Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz

$$[\text{g-Strophanthin}] \cdot [\text{Rezeptor}] = K_D \cdot [\text{g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex}]$$

erfolgt die Bindung des g-Strophanthins an den Rezeptor mit umso höherer Affinität, je kleiner die Dissoziationskonstante ist. Die Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes unter Äquilibriumbedingungen gibt an, bei welcher freien g-Strophanthin-Konzentration 50% der Herzglykosid-Rezeptoren mit g-Strophanthin besetzt sind. Diese Dissoziationskonstante (K_D) läßt sich aus dem Quotienten der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} und der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes errechnen.

Schneller läßt sich jedoch die Dissoziationskonstante unter Gleichgewichtsbedingungen durch eine konzentrationsabhängige Bindung von g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen bestimmen. Am Beispiel der Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Nierenmembranen wird der Versuch erläutert (Abb. 17): Bei gleichbleibender Rezeptor-Konzentration und steigender g-Strophanthin-Konzentration im Inkubationsmedium wird bis zu einem Äquilibrium mehr g-Strophanthin gebunden. Sind jedoch alle Rezeptoren mit einem g-Strophanthin-Molekül besetzt, wird auch bei noch so hohen Glykosid-Konzentrationen nicht mehr gebunden werden. Einer Sättigungskinetik folgend wird demzufolge die Bindungskurve ein Plateau erreichen (Abb. 17A), das sich allerdings erst nach relativ langer Inkubationszeit einstellt. Bei niedrigen g-Strophanthin-Konzentrationen (z.B. 4×10^{-9} M) wird das Gleichgewicht der Bindung regelmäßig nach 30 bis 60 min erreicht. Bei höheren Konzentrationen wird sich das Äquilibrium der Bindung unter optimalen Versuchsbedingungen (Temperatur, pH, Ionenkonzentrationen, usw.) schneller einstellen. Bei allen Bindungsversuchen wurde das Äquilibrium der Bindung für jede einzelne Membranpräparation der verschiedenen Organe der beiden untersuchten Spezies vorher bestimmt (siehe Abb. 5).

Wenn nun eine Asymptote an dieses Plateau der Sättigungskurve angelegt wird, ergibt der Schnittpunkt dieser Asymptote mit der Ordinate die maximale Bindungskapazität der inkubierten Zell-Membranen für g-Strophanthin.

In Abb. 17B sind die gleichen Bindungsdaten nach Scatchard (1949) aufgetragen. Durch die Meßpunkte läßt sich eine Gerade ziehen. Der Vorteil dieser Auftragungsweise besteht darin, daß aus dem Anstieg der Geraden durch die Meßpunkte die Dissoziationskonstante K_D des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes errechnet werden kann. Hier an Meerschweinchen-Nieren-Membranen errechnet sich eine $K_D = 1.0 \times 10^{-7}$ M. Außerdem ergibt der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate jetzt direkt die maximale Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen für g-Strophanthin.

Eine Gerade bedeutet darüber hinaus, daß wahrscheinlich ein einheitliches Bindungsprotein (Rezeptor) vorliegt, da alle Rezeptoren, auch bei steigenden g-Strophanthin-Konzentrationen im gemessenen Konzentrationsbereich (hier 4×10^{-9} M bis 5×10^{-6} M) die gleiche Affinität gegenüber g-Strophanthin haben unabhängig von der g-Strophanthin-Konzentration.

Die Abbildungen 17 - 25 zeigen die konzentrationsabhängige Bindung von g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen von

- Abb. 17 : Meerschweinchen-Niere
- Abb. 18 : Meerschweinchen-Erythrocyten
- Abb. 19 : Meerschweinchen-Hirn
- Abb. 20 : Meerschweinchen-Herz
- Abb. 21 : Meerschweinchen-Skelettmuskel
- Abb. 22 : Ratten-Niere
- Abb. 23 : Ratten-Hirn
- Abb. 24 : Ratten-Skelettmuskel
- Abb. 25 : Ratten-Herz

Ein gerader Kurvenverlauf in der Scatchard-Auftragung der Bindungsdaten beim Meerschweinchen konnte außer an Nieren-Membranen (Abb. 17) nur noch an Erythrocyten- und Herzmembranen gefunden werden (Abb. 18 und 20). Übereinstimmend (innerhalb eines experimentellen Fehlers) wurde die Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes mit $K_D = 1.5 \times 10^{-7}$ M (Meerschweinchen-Erythrocyten), $K_D = 1.0 \times 10^{-7}$ M (Meerschweinchen-Niere) und $K_D = 1.1 \times 10^{-7}$ M (Meerschweinchen-Herz) ermittelt. Die Versuche zeigen, daß in den drei untersuchten

Organen offensichtlich ein einheitlicher Rezeptor vorliegt und daß sich die Affinität des Rezeptors gegenüber g-Strophanthin bei steigenden g-Strophanthin-Konzentrationen nicht ändert. Die Zahl der Bindungsstellen pro Enzymeinheit ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität der einzelnen Spezies und Organe sind aus der Tabelle 1 ersichtlich (Seite 49).

Bei Meerschweinchen-Hirn-Membranen (Abb. 19) und Ratten-Hirn-Membranen (Abb. 23) folgt die Bindungskinetik jedoch nicht mehr einer Geraden, was bedeutet, daß mit steigenden g-Strophanthin-Konzentrationen zwar mehr g-Strophanthin gebunden wird, aber mit immer geringerer Affinität. Die Affinität ändert sich also konzentrationsabhängig.

Eine zeitabhängige Konformationsänderung während des Inkubierens (wie oben unter 3.1.1. beschrieben) scheint für den gekrümmten Kurvenverlauf hier nicht die Ursache zu sein, da der g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex aus Meerschweinchen-Hirn über mehrere Stunden stabil bleibt (Abb. 3) und beim Ratten-Hirn erst nach etwa 3 Stunden merklich zerstört wird (Abb. 8). Ein gekrümmter Kurvenverlauf wird auch dann erhalten, wenn die Inkubationszeit verkürzt (nicht gezeigt) oder die inkubierte Proteinmenge erhöht (Meerschweinchen-Hirn, Abb. 26) oder der pH-Wert im Inkubationsmedium verändert wird (Ratten-Hirn, Abb. 27).

Ein anderes Ergebnis zeigen die Versuche mit isolierten Meerschweinchen-Skelettmuskel-Membranen. Aus dem zeitabhängigen Verlauf der Bindungskurve (Abb. 6) ergab sich, daß die Bindung rasch ein Maximum durchläuft und daß der g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex über längere Zeit nicht stabil bleibt, so daß die Bindung wieder abnimmt. Deshalb wurde der jeweilige Zeitpunkt des Maximums der Bindung zur Berechnung der Bindungskapazität und -affinität genommen.

Inkubiert man nun Skelettmuskel-Membranen mit ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen g-Strophanthin unter diesen angenommenen Äquilibriumbedingungen (z.B. 17 min in Abb. 6), so erhält man in der Scatchard-Auftragung (Abb. 21B) einen gekrümmten Kurvenverlauf. Inkubiert man noch länger, z.B. 60 min lang, so mißt man in einer Phase, in der der Zerfall des

g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes die Neubildung überwiegt. Der entsprechende Kurvenverlauf ist noch stärker gekrümmt. Das bedeutet, daß sich die Affinität des Rezeptors gegenüber g-Strophanthin mit steigender g-Strophanthin-Konzentration zunehmend ändert. Wir haben deshalb das Maximum der g-Strophanthin-Bindung der Berechnung der Bindungskapazität und Bindungsaffinität zugrundegelegt unter der Annahme, daß die nachfolgende Abnahme der Glykosidbindung einer artifiziellen, möglicherweise inkubationsbedingten Schädigung der Zellmembranen entspricht. Das Maximum der Glykosidbindung wird als apparentes Äquilibrium angenommen und liegt allen weiteren konzentrationsabhängigen Bindungsexperimenten zugrunde.

Wird die Inkubationszeit in die steile Anstiegsphase der Bindung gelegt (z.B. 5 min), in der definitionsgemäß das Reaktionsgleichgewicht noch nicht vorliegt und die Bildung des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes überwiegt, so erhält man eine Gerade in der Scatchard-Auftragung. Diese Gerade bringt zum Ausdruck, daß zu diesem Inkubationszeitpunkt alle Herzglykosid-Rezeptoren die gleiche Affinität zum g-Strophanthin haben unabhängig von der g-Strophanthin-Konzentration (Scatchard, 1949; Boeynaems und Dumont, 1975; Jacobs et al., 1975). Dem Anstieg der Geraden entspricht eine Dissoziationskonstante von $K_D = 8.8 \times 10^{-8}$ M. Dabei fällt auf, daß die drei Kurven offensichtlich dem gleichen Schnittpunkt mit der Ordinate zustreben. Das würde aber bedeuten, daß mit steigender Inkubationszeit der Herzglykosid-Rezeptor als solcher und damit die Gesamtzahl der maximalen Bindungsstellen unverändert erhalten bleiben und daß lediglich aufgrund einer wie auch immer gearteten Konformationsänderung der Membran bei längerer Inkubation bei 37°C die Affinität des Herzglykosid-Rezeptors gegenüber g-Strophanthin abnimmt.

Ein identisches Bindungsverhalten zeigte die konzentrationsabhängige Bindung von g-Strophanthin an Ratten-Skelettmuskel-Membranen (Abb. 24). Das zeitabhängige Bindungsmaximum des verwendeten Enzyms wurde in diesem Experiment mit 4 min bestimmt (nicht gezeigt). Die entsprechende Bindung von ^3H -g-Strophanthin

innerhalb von 4 min in Gegenwart von steigenden Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins ergab einen gekrümmten Kurvenverlauf. Nach 10 min Inkubationszeit war die Abnahme der Affinität zum Rezeptor noch deutlicher. Inkubiert man aber nur 2 min lang, so erhält man wiederum eine Gerade, aus deren Anstieg die Dissoziationskonstante mit $K_D = 1.3 \times 10^{-7}$ M errechnet werden kann. Der gleiche Schnittpunkt aller drei Kurven mit der Ordinate verweist wieder auf die gleichbleibende Anzahl der maximalen Bindungsstellen.

Sharma und Banerjee (1978) finden an Ratten-Skelettmuskel-Membranen eine $K_D = 9.6 \times 10^{-7}$ M. Aus ihren experimentellen Bedingungen ergibt sich aber eine Inkubationszeit von 20 min. Nach so langer Inkubationszeit ist aber unseren Ergebnissen (Abb. 11) zu entnehmen, daß das Bindungsoptimum längst überschritten ist. Das könnte die Erklärung dafür sein, daß die von uns ermittelte K_D um etwa den Faktor 10 niedriger ist, wenngleich sie auch im gleichen Größenordnungsbereich liegt.

Bei der konzentrationsabhängigen Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Herz-Membranen (Abb. 25) fiel auf, daß bei der Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard regelmäßig ein gekrümmter Kurvenverlauf gefunden wird, unabhängig davon, ob die Inkubationszeit vor, im oder nach dem zeitabhängigen Bindungsmaximum liegt (Zeitdaten entsprechend aus Abb. 7).

Der gekrümmte Kurvenverlauf spricht an sich für das Vorhandensein von mindestens zwei verschiedenen Bindungsproteinen mit verschiedenen Bindungskapazitäten und Bindungsaffinitäten (Bartels und Hesch, 1973; Weder et al., 1974; Chamness und McGuire, 1975; Hollemans und Bertina, 1975; Boeynaems und Dumont, 1975). Aber auch andere Erklärungen für einen gekrümmten Kurvenverlauf in der Scatchard-Auftragung wurden beschrieben: Vorhandensein mehrerer Populationen von untereinander unabhängigen Rezeptoren (Weidemann et al., 1970; Kahn et al., 1974; de Meyts und Roth, 1975); negative Cooperativität innerhalb einer oder auch mehrerer Rezeptor-Populationen (de Meyts und Roth, 1975; Scaf, 1975; Boeynaems und Dumont, 1975; de Meyts, 1976); unterschiedliche Bindungsaffinität gegenüber radioaktiv

markierten und nicht markierten Liganden (Hollemaans und Bertina, 1975); ungenaue Bestimmungen der freien Pharmakon-Konzentration oder unspezifische Interaktionen (Chang et al., 1975); Interaktionen unter den Molekülen eines Liganden, wie Polymerisation, Isomerisation und Aggregationen (Jacobs et al., 1975); Instabilität des Rezeptors (Erdmann et al., 1976b); stufenweise Interaktion in mehreren Schritten zwischen Ligand und Rezeptor (Boeynaems und Dumont, 1977); radioaktive Verunreinigungen (Reimann und Soloff, 1975) und überhaupt Artefakte (Cuatrecasas und Hollenberg, 1975). Da mit den vorliegenden Daten das Problem der Interpretation eines gekrümmten Kurvenverlaufes in der Scatchard-Auftragung bereits an anderer Stelle (Erdmann et al., 1976b) ausführlich diskutiert wurde, soll hier jedoch nicht mehr näher darauf eingegangen werden.

Unter der Annahme, daß es sich hier um zwei verschiedene Rezeptor-Populationen handeln könnte, wurde mit diesen Bindungsdaten (Ratten-Herz) das mathematische Modell der Arbeitsgruppe Klingenberg (Weidemann et al., 1970) für zwei verschiedene Rezeptoren angewendet. Mit diesem Computerprogramm wurden dann die apparenten Dissoziationskonstanten für zwei verschiedene voneinander unabhängige Rezeptoren bestimmt. Ein hochaffiner Rezeptor mit einer Dissoziationskonstanten von 1.0×10^{-7} M und einer niedrigen Bindungskapazität von etwa einem Zehntel des gesamten gebundenen g-Strophanthins und ein niederaffiner Rezeptor mit hoher Bindungskapazität von neun Zehntel der gesamten Bindung und einer Dissoziationskonstante im Bereich von 2.8×10^{-5} M sind diesem Rechenmodell entsprechend möglich. Das Ergebnis dieser approximativen Bestimmung soll aber nicht als Beweis dafür angeführt werden, daß es bei der Ratte im Herz zwei verschiedene voneinander unabhängige Rezeptoren gibt; insbesondere, da die späteren Messungen an intaktem, sich kontrahierendem Myokard zeigen, daß dort nur eine (hochaffine) g-Strophanthin-Rezeptor-Population nachweisbar ist (siehe 3.3.2.). Auffällig bleibt jedoch die Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen und der an Ratten-Nieren-Membranen ermittelten Dissoziationskonstanten von $K_D = 1.0 \times 10^{-5}$ M (Abb. 22). Die Bindungsdaten jenes Versuches lassen in der Scatchard-Auftragung

Tabelle 1: Rezeptoraffinität und Zahl der Bindungsstellen
pro Enzymeinheit bei verschiedenen Spezies (bei 37°C)

		Rezeptor- affinität K_D (M)	Zahl der Bindungsstellen pro Enzymeinheit (Picomole)
MENSCH	Herz	$2.5 \times 10^{-9}^+$	130 ⁺
MEERSCHWEINCHEN			
	Herz	1.8×10^{-7}	194
	Hirn	2.6×10^{-8}	124
	Niere	1.5×10^{-7}	379
	Skelettmuskel	6.2×10^{-8}	275
	Erythrocyten	1.5×10^{-7}	-
RATTE	Herz	1.1×10^{-7} (2.3×10^{-5}) ⁺⁺	15 150 - 515
	Hirn	2.9×10^{-8}	123
	Niere	1.0×10^{-5}	72
	Skelettmuskel	1.3×10^{-7}	130
	Erythrocyten	-	-

⁺ Erdmann und Hasse, 1975

⁺⁺ Dissoziationskonstante einer vermuteten Rezeptor-Subpopulation
(siehe Seite 48 und 50)

(Abb. 22B) aber nur einen Rezeptor-Typ erkennen (Gerade) mit einer um den Faktor 100 niedrigeren Affinität zum g-Strophanthin, wobei sich die Affinität auch bei steigenden g-Strophanthin-Konzentrationen nicht ändert. Es wäre somit vorstellbar, daß der niederaffine Glykosidrezeptor des Herzens einem zweiten Bindungsprotein entspricht, welches in der Niere vorherrscht ($K_D = 10^{-5}$ M).

An Ratten-Erythrocyten konnte keine sichere spezifische Bindung nachgewiesen werden, die ausreichen würde, um eine sicher reproduzierbare konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin messen zu können (siehe 3.1.1.). Bei der vermuteten geringen Affinität des Rezeptors zum Herzglykosid ist damit eine exakte Messung mit unseren Methoden nicht möglich.

3.1.3. Kinetische Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Reversibilität der Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor wird unterschiedlich beurteilt:

Die Auffassungen reichen von irreversibel (Albers et al., 1968; Yoda und Hokin, 1970) über schwer reversibel (Baker und Manil, 1968; Sen et al., 1969) bis leicht reversibel (Matsui und Schwartz, 1968; Barnett, 1970; Tobin und Brody, 1972). Sollte die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor (wie unter 3.1. beschrieben) dem Massenwirkungsgesetz gehorchen (Hansen, 1971; Hansen und Skou, 1973; Erdmann und Schoner, 1973) und reversibel sein (Gleichung 1), müßte es möglich sein, die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes zu bestimmen. Durch die Ermittlung dieser Konstanten läßt sich außerdem die Dissoziationskonstante K_D des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes errechnen (Quotient aus k_{-1} und k_{+1}). Darüberhinaus kann hierdurch die Aussagekraft und Zulässigkeit der Bestimmung der Dissoziationskonstanten über die konzentrationsabhängige Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor (Scatchard-Auftragung) beurteilt werden. Weiterhin

Können über die Ermittlung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten die thermodynamischen Eigenschaften der *g*-Strophanthin-Bindung errechnet werden.

3.1.3.1. Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Bindung

Am Beispiel der Ratten-Skelettmuskel-Membranen (Abb. 28) soll das Prinzip der Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten erläutert werden. In Abb. 28A wird gezeigt, daß die Bindung von *g*-Strophanthin ein zeit- und temperaturabhängiger Prozeß ist. Durch Verwendung von ^3H -*g*-Strophanthin läßt sich beweisen, daß mit steigender Inkubationszeit auch mehr ^3H -*g*-Strophanthin gebunden wird und zwar in Abhängigkeit von der Temperatur im Inkubationsmedium. Aus Abb. 28A ergibt sich weiter, daß das Bindungsmaximum bei 37°C bereits nach 4 min, bei 21°C nach 6 min noch nicht und bei 4°C erst nach vielen Stunden (nicht gezeigt) erreicht wird. Der Zeitpunkt des Bindungsmaximums wird auch hier wieder als Äquilibrium der Bindung bezeichnet, d.h., daß die Bildung des ^3H -*g*-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes mit dem Zerfall des Komplexes im Gleichgewicht steht.

3.1.3.2. Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten

$$k_{+1}$$

Aus der Tabelle 1 kann entnommen werden, daß eine Enzymeinheit ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbare ATPase aus Ratten-Skelettmuskel-Membranen etwa 130 Picomole *g*-Strophanthin spezifisch zu binden vermag. Somit ist bekannt, wieviele Picomole Bindungsstellen bei der Inkubation einer kleinen Menge von Membranproteinen inkubiert worden sind. Dadurch ist auch die Anfangskonzentration des freien Glykosidrezeptors in jedem Inkubationsversuch bekannt. Gleichzeitig kann die Anzahl der Rezeptoren zur Kontrolle auch nochmals durch eine konzentrationsabhängige Bindung (Abb. 24) gemessen werden. Wählt man nun die inkubierte Proteinmenge derart, daß die molare Rezeptor-Konzentration annähernd, aber nicht gleich der der *g*-Strophanthin-Konzentration ist, so kann die der je-

weiligen Temperatur entsprechende Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} der Bildung des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes berechnet werden, wenn zugleich auch die initiale g-Strophanthin-Konzentration bekannt ist und die pro Zeiteinheit gebildete Menge des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes experimentell bestimmt wird (Erdmann und Schoner, 1973; Erdmann und Hasse, 1975). Dazu setzt man die Meßwerte in eine Gleichung für eine Reaktionskinetik 2. Ordnung ein:

$$k_{+1} = \frac{2.303}{(a-b) \cdot t} \cdot \log \frac{b \cdot (a-x)}{a \cdot (b-x)} \quad [M^{-1} \text{ sec}^{-1}] \quad (\text{Gleichung 3})$$

a = g-Strophanthin-Anfangskonzentration (Substratkonzentration)

b = Anfangskonzentration des freien Rezeptors
(Rezeptor-Konzentration)

x = Menge des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes zur Zeit t (sec)

Die lineare Beziehung der zeit- und (Abb. 28B) temperaturabhängigen Bindungskinetik bedeutet, daß der Prozeß der Bildung des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes einer bimolekularen Reaktion entspricht. Aus dem Anstieg der einzelnen Geraden läßt sich für die einzelnen Inkubationstemperaturen die jeweilige Assoziationsgeschwindigkeitskonstante errechnen. Die einzelnen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten für die Bildung des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes aus Ratten-Skelettmuskel-Membranen bei den verschiedenen Temperaturen werden in Tabelle 2 zusammengefaßt (Seite 61).

3.1.3.3. Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1}

Über das Äquilibrium der Bindung wurde ausgeführt, daß zu diesem Zeitpunkt ein Gleichgewicht besteht zwischen der Neubildung des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes und dem Zerfall dieses Komplexes. Die Dissoziation des Komplexes wird aber erst erfaßbar, wenn man ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe in Gegenwart hoher Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Löst sich ein ^3H -g-Strophanthin-Molekül von seinem Rezeptor, so kann im folgenden Assoziationsprozeß wieder das gleiche oder ein anderes g-Strophanthin-Molekül gebunden werden.

Inkubiert man nun ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe zusammen mit hohen Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins, so ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, daß ein von seinem Rezeptor abdissoziiertes ^3H -g-Strophanthin-Molekül wieder einen freien Rezeptor findet. Ein freier Rezeptor wird nur mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von etwa 1 : 1 000 000 (g-Strophanthin-Konzentration im Inkubationsmedium etwa 10^{-3} M) wieder ein ^3H -g-Strophanthin-Molekül "einfangen" können. Eine freie Bindungsstelle wird unter diesen Versuchsbedingungen sofort von einem nicht markierten g-Strophanthin-Molekül besetzt werden. Das bedeutet, daß mit steigender Inkubationszeit die Konzentration des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes abnimmt und infolgedessen das freie ^3H -g-Strophanthin im Inkubationsmedium zunimmt. Beides muß meßbar sein, wenn die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor reversibel ist. Wesentlich einfacher und auch genauer ist allerdings die Bestimmung des noch membrangebundenen ^3H -g-Strophanthins.

In Abb. 29 wird gezeigt, daß die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor aus Ratten-Skelettmuskel-Membranen reversibel und stark temperaturabhängig ist. Während bei 4°C nach einer Stunde erst etwa 10% des ursprünglich gebundenen ^3H -g-Strophanthins abdissoziiert ist, sind bei 37°C bereits nach 6 min etwa 90% des ^3H -g-Strophanthins am Herzglykosid-Rezeptor durch nicht markiertes g-Strophanthin ersetzt. Bei 0°C

hingegen kann selbst nach vielstündiger Inkubationszeit nur eine sehr geringe Abdissoziation gemessen werden (nicht gezeigt), womit gleichzeitig auch bewiesen wird, daß der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex bei dieser Temperatur lange Zeit stabil bleibt und auch als solcher leicht isoliert werden kann.

Bei halblogarithmischer Auftragung des gebundenen ^3H -g-Strophanthins in % kann man ersehen, daß die Dissoziation des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes bei allen Temperaturen einer Reaktionskinetik 1. Ordnung folgt. Die einzelnen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes aus Ratten-Skelettmuskel-Membranen sind in Tabelle 2 eingetragen. Der Vergleich der Bestimmungen der Dissoziationskonstanten des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes aus konzentrationsabhängiger Bindung von ^3H -g-Strophanthin (hier am Beispiel der Ratten-Skelettmuskel-Membranen) unter Gleichgewichtsbedingungen und aus dem Quotienten der beiden Geschwindigkeitskonstanten ($K_D = k_{-1}/k_{+1}$) weist eine gute Übereinstimmung der Werte auf und zeigt damit die Genauigkeit der Methode.

An Meerschweinchen-Skelettmuskel-Membranen (Abb. 31) und Meerschweinchen-Nieren-Membranen (Abb. 32) wurden die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten nur bei 37°C bestimmt. Die aus diesen Geschwindigkeitskonstanten jeweils errechneten Dissoziationskonstanten K_D zeigen ebenfalls eine gute Übereinstimmung innerhalb der experimentellen Fehlerbreite mit den durch konzentrationsabhängige Bindung ermittelten Werten (Übersicht Tabelle 5 Seite 69).

3.1.3.4. Thermodynamische Eigenschaften der *g*-Strophanthin-Rezeptor-Bindung

Seit Jahren ist bekannt, daß in biologischen Membranen die physikalischen Eigenschaften der Lipide die Interaktion zwischen Proteinen und Lipiden und infolgedessen auch die Aktivität membrangebundener Enzyme beeinflussen. Speziell für die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbare ATPase konnte gezeigt werden, daß ihre Aktivität abhängig ist von Gehalt und Zusammensetzung der Membranlipide (Charnock et al., 1971; Kimelberg und Papahadjopoulos, 1972; Taniguchi und Iida, 1972a; Taniguchi und Iida, 1973; Stahl, 1973; Grisham und Barnett, 1973; Charnock et al., 1973; Charnock et al., 1975; Ayala et al., 1976; Miller und Woodhouse, 1977; Charnock et al., 1977).

Aus der Strukturanalyse von Membranen hat sich ergeben, daß unter physiologischen Bedingungen die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten im Inneren der Lipid-Doppelschicht in einer Art Fließgleichgewicht existieren zwischen gelartigem und flüssigem Zustand. Die Lipid-Dynamik wird dabei entscheidend vom reversiblen Übergang der Kohlenwasserstoffketten von der Flüssigkeits- zur Gelphase innerhalb der hydrophoben Lipid-Doppelschicht der Biomembran beeinflusst. Es wird angenommen, daß solche Phasenverschiebungen ober- oder unterhalb einer kritischen Temperatur auch Konformationsänderungen der Membranproteine bewirken und damit auch eine temperaturabhängige Änderung der Aktivität der membrangebundenen Enzyme.

In der Arrhenius-Auftragung der Temperaturabhängigkeit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase zeigt sich dann häufig ein Knick in der Aktivitätskurve, der sich bei verschiedenen Spezies und Organen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigt (z.B. Kaninchen-Niere 18°C , Charnock et al., 1973; Rinder-Hirn 20°C , Taniguchi und Iida, 1972a, oder 25°C Charnock et al., 1977). Es konnte gezeigt werden, daß alle Zellmembranen nach Lipolyse mit Phospholipase A oder Phospholipase C oder Natriumdesoxicholat-Behandlung ihre ATPase-Aktivität und Bindungsfähigkeit für *g*-Strophanthin weitgehend verloren und daß durch Zugabe von natürlichen Phospholipiden (z.B. Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol) zum

Inkubationsmedium beide Eigenschaften nahezu vollständig wieder hergestellt werden können. Inwieweit die Phospholipide lediglich über polare Molekülgruppen die negative Ladung und Hydrophobie in der Nachbarschaft der enzymatisch aktiven Stelle der ATPase gewährleisten oder ob sie sogar wesentliche Bestandteile der Membran-ATPase sind, wird unterschiedlich beurteilt (Taniguchi und Iida, 1973; Charnock et al., 1977). Experimentell gesichert ist, daß nach Lipolyse (oder Detergenzien-Behandlung) der Knick in der temperaturabhängigen Aktivitätskurve verschwindet und nach Zugabe von Phospholipiden wieder auftritt. Unabhängig von der kontroversen Diskussion, ob mit Detergenzien behandelte Membranen eine Verminderung oder eine Erhöhung der maximalen Bindungsstellen zeigen (Taniguchi und Iida, 1973; Charnock et al., 1977) ergibt sich in beiden Fällen die deutliche Möglichkeit, präparativ die ATPase-Aktivität und damit eventuell auch die Bindung von g -Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor zu beeinflussen. Da wir bei den einzelnen Membranpräparationen auch Desoxicholat verwenden, wollten wir ebenfalls an einigen Organen diese beschriebenen temperaturabhängigen Membranphänomene untersuchen. Quantifizierbare Bindungsstudien darüber liegen unseres Wissens noch nicht vor.

3.1.3.4.1. Aktivierungsenergie der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase

Werden die Bindungsdaten des g -Strophanthin-Rezeptor-Komplexes (Ratten-Skelettmuskel-Membranen) aus den Bestimmungen der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten und der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten als Funktion der Temperatur nach Arrhenius aufgetragen (Abb. 30A), so ergibt sich, daß sich beide Konstanten etwa gleich stark mit steigender Temperatur verändern. Daraus resultiert eine nur sehr geringe Änderung der Affinitätskonstanten ($K_A = 1/K_D$) in Abhängigkeit von der Temperatur (Abb. 30B). Entsprechend gering sind auch die Änderungen der freien Energie ΔG^0 der Bindung des g -Strophanthins an den Herzglykosid-Rezeptor (Tabelle 2). Unter Standardbedingungen konnte die freie Energie mit $-9.5 \text{ Kcal} \cdot \text{Mol}^{-1}$ errechnet werden.

Aus dem temperaturabhängigen Verlauf der Affinitätskonstante läßt sich die Standard-Enthalpie ΔH° des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes errechnen (hier $-2.1 \text{ Kcal} \cdot \text{Mol}^{-1}$). Aus der Tabelle 2 ergibt sich weiter, daß die negative freie Energie ($-\Delta G^{\circ}$) mehrfach höher ist als die Enthalpie ($-\Delta H^{\circ}$), was einer erheblichen Zunahme der Entropie durch den Bindungsprozeß entspricht. Die Differenz der freien Energie ΔG° und der Enthalpie ΔH° (Entropieänderung ΔS°) in Abhängigkeit von der Temperatur beträgt bei den verschiedenen Temperaturen einheitlich $24 \text{ cal} \cdot \text{Grad}^{-1} \cdot \text{Mol}^{-1}$. Aus der Gegenüberstellung der Werte ergibt sich, daß die freie Energie der Bindung (ΔG°) wesentlich negativer ist als die freie Enthalpie ΔH° und daß damit die Differenz zwischen ΔG° und ΔH° durch den hohen Entropie-Anteil zustande kommt. Die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor ist ein exergoner Prozeß, bei dem Energie frei wird. Unter Bezug auf Gleichung 1 bedeuten diese thermodynamischen Parameter für den Herzglykosid-Rezeptor hier aus Ratten-Skelettmuskel-Membranen, daß bei der Bildung des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes 2.1 Kcal als Wärme frei werden. Das System könnte bei geeigneter Versuchsanordnung maximal 9.5 Kcal Arbeit leisten (z.B. in Form von elektrischer Energie). Die Entropieänderung beträgt einheitlich $24 \text{ cal} \cdot \text{Grad}^{-1} \cdot \text{Mol}^{-1}$.

3.1.3.4.2. Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstanten

Die Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren korreliert direkt mit der Zahl der $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase-Moleküle (Kyte, 1972; Lane et al., 1973; Hokin, 1974; Hopkins et al., 1976) und den Nucleotidbindungsstellen (Erdmann et al., 1976a). Dieser stöchiometrischen Beziehung liegt der Nachweis eines die ganze Zellmembran durchspannenden Proteinmoleküls zugrunde (Kyte, 1972), das auf der Innenseite der Membran das aktive Zentrum der ATPase und auf der Membranaußenseite die Glykosidbindungsstelle aufweist.

Es ist sehr gut vorstellbar, daß durch Phasenverschiebungen innerhalb der Lipidmatrix der Membran (durch welche Faktoren sie auch immer ausgelöst sein mögen) auch der Herzglykosid-

Rezeptor betroffen ist. Man würde erwarten, daß dann auch die temperaturabhängige Bindungskurve von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor einen Knick in der Arrhenius-Auftragung zeigt.

Am Beispiel der Ratten-Skelettmuskel-Membranen (Abb. 30) wird aber ersichtlich, daß eine solche temperaturabhängige Beeinflussung der Bindungseigenschaften zumindest an diesem Organ nicht besteht, da sich zweifelsfrei eine Gerade ergibt. Allerdings ist das Skelettmuskel-Membranenzym auch mit Hilfe von 0.3% Desoxicholat präpariert worden. Der gerade Kurvenverlauf könnte somit auch Ergebnis dieser Einwirkung sein (Charnock et al., 1977). Möglicherweise liegt es aber auch am unterschiedlichen Gehalt und Lipid-Muster der Membran, daß an Ratten-Skelettmuskel-Membranen nur eine lineare temperaturabhängige Dissoziationskonstante ermittelt werden konnte. Solche Abhängigkeiten wären verständlich, denn z.B. bei Hirnmembranen kann aufgrund der enthaltenen Cerebroside von einer ganz anderen Lipidmatrix und insgesamt von einem höheren Gehalt an Lipiden ausgegangen werden.

Deshalb wurde die Temperaturabhängigkeit der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor auch an Hirngewebe untersucht. Die Bindungsdaten dieser Versuche (Meerschweinchen-Hirn Abb. 33 und 34) sind in Tabelle 3 (Seite 62) enthalten. Die Rezeptor-Anfangskonzentration wurde wie unter 3.1.3.1. beschrieben errechnet entsprechend der durch konzentrationsabhängige Bindung ermittelten Zahl der Bindungsstellen pro Enzymeinheit (Tabelle 1).

In Abb. 35A sind die Bindungsdaten mehrerer Versuche nach Arrhenius aufgetragen. Es zeigt sich kein einheitlicher Kurvenverlauf. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ist linear und mäßig temperaturabhängig, die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante ist wesentlich temperatursensitiver, so daß auch eine entsprechend stark empfindliche Gleichgewichtskonstante zu erwarten ist (Abb. 35B). Bei der temperaturabhängigen Verlaufskurve der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten fällt auf, daß eine gleichbleibende lineare Beziehung offensichtlich nur im Bereich

zwischen 37° und 21°C besteht; bei 3°C weicht die Kurve deutlich ab. Aufgrund der stärkeren Temperaturempfindlichkeit der k_{-1} im Verhältnis zur k_{+1} , wird in der Verlaufskurve die Änderung der Gleichgewichtskonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur wesentlich geringer.

Der gleiche Effekt wird auch an Ratten-Hirn-Membranen gefunden. Die Ergebnisse der Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (Abb. 36) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (Abb. 37) sind in Abb. 38 nach Arrhenius aufgetragen und in der Tabelle 4 (Seite 63) zusammengefaßt. Aus den Arrheniusauftragungen dieser Versuchsergebnisse an Ratten-Hirn- und Meerschweinchen-Hirn-Membranen ergibt sich zunächst optisch ein Knick in der Affinitätskurve bei etwa 20°C . Die Meßpunkte bei 3°C liegen deutlich außerhalb einer linearen Beziehung. Dieses Phänomen könnte als Hinweis dafür angesehen werden, daß auch an Hirngewebe von Meerschweinchen und Ratte durch temperaturabhängige Phasenverschiebungen innerhalb der Lipidmatrix Konformationsänderungen der Membranproteine und damit auch der Bindung eintreten. Die kritische Temperatur für diese Phasenübergänge liegt in den hier gezeigten Versuchen bei etwa 20°C und würde gut übereinstimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Charnock et al., 1971; Taniguchi und Iida, 1972; Grisham und Barnett, 1973; Charnock et al., 1975; Ayala et al., 1976; Palatini et al., 1976), zumal die Präparation der verwendeten Hirnmembranen ohne Zusatz von Detergenzien (Natriumdesoxicholat) erfolgte und infolgedessen das Lipidgefüge der Membran möglicherweise durch die Präparation weniger stark gestört ist. Bei den Meßpunkten um 3°C handelt es sich um relativ schwierige, im einzelnen schwer reproduzierbare Messungen, da diese Temperatur sehr exakt eingehalten werden muß, denn schon Abweichungen von nur 1°C führen zu deutlichen Änderungen der Geschwindigkeitskonstanten. Als besonders temperaturempfindlich hat sich bei unseren Untersuchungen die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante erwiesen. Ob es sich bei den gezeigten temperaturabhängigen Änderungen der Aktivierungsenergie der Bindungseigenschaften aber wirklich um ein allgemeines Membranphänomen handelt, kann aufgrund der von uns durchgeführten Versuche

nicht zweifelsfrei erhärtet werden. Es wären weitere Messungen nötig, wobei insbesondere die Bindungseigenschaften der Membran im Temperaturbereich von 3°C bis 15°C einer genaueren Untersuchung bedürften. In Kenntnis der experimentellen Schwierigkeiten bei einer Temperatur von 3°C könnten deshalb wegen des Fehlens von Meßpunkten z.B. bei 10°C und 15°C die Meßergebnisse bei 3°C auch als Artefakte gedeutet werden. Die von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesenen Phasenverschiebungen oberhalb und unterhalb einer kritischen Temperatur mit konsekutiver Änderung der ATPase-Aktivität müssen nicht unbedingt auch eine Beeinflussung der Glykosidbindungsstelle bewirken (siehe lineare Temperaturabhängigkeit bei Ratten-Skelettmuskel-Membranen). Es wäre denkbar, daß die Glykosidbindungsstelle aus der Membran weiter herausragt (und damit von den Phospholipidmolekülen unabhängig ist), während das enzymatisch aktive Zentrum des ATPase-Moleküls von der umgebenden Phospholipidstruktur stärker beeinflusst wird.

Diese Interpretation der Phasenverschiebungen innerhalb der Membranlipide als Ursache und Erklärung für den nicht linearen Kurvenverlauf in der Arrhenius-Auftragung ist auch nicht unwidersprochen geblieben. Joiner und Lauf (1979) haben an Schaf-Erythrocyten gefunden, daß die Arrhenius-Diagramme des transmembranösen Kationen-Transportes bei Erythrocyten mit hohem Kaliumgehalt geknickt und bei Erythrocyten mit niedrigem Kaliumgehalt geradlinig verlaufen. Unterschiedliche Kationenkonzentrationen im Inkubationsmedium bei den hier beschriebenen Versuchen an Ratten und Meerschweinchen können jedoch nicht die Ursache für den linearen oder nicht linearen Kurvenverlauf der Arrheniusdiagramme sein, da durch mehrere Waschvorgänge bei der Membranpräparation insbesondere Kaliumionen weitgehend eliminiert worden sind und flammenphotometrisch auch nicht mehr nachweisbar waren. Wahrscheinlich sind bei den von Joiner und Lauf (1979) beschriebenen Experimenten die Membranen der verschiedenen Erythrocytenpopulationen unterschiedlich in ihrer Membranzusammensetzung.

Tabelle 2: Kinetische und thermodynamische Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung

RATTE-SKELETTMUSKEL								
Temperatur °C	4	10	15	21	30	37		
Temperatur °K	277	283	288	294	303	310		
Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} ($\text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	0.6×10^3	1.3×10^3	2.4×10^3	0.6×10^4	1.8×10^4	3.3×10^4		
Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} (sec^{-1})	0.7×10^{-4}	1.5×10^{-4}	3.5×10^{-4}	0.9×10^{-3}	2.9×10^{-3}	0.6×10^{-2}		
Dissoziationskonstante $K_D = k_{-1}/k_{+1}$ (M)	1.1×10^{-7}	1.2×10^{-7}	1.4×10^{-7}	1.5×10^{-7}	1.6×10^{-7}	1.8×10^{-7}		
Dissoziationskonstante K_D (Scatchard) (M)						1.3×10^{-7}		
freie Energie ΔG^0 (Kcal/mol)	- 8.8	- 8.9	- 9.0	- 9.2	- 9.4	- 9.6		
Enthalpie unter Standardbedingungen ΔH^0 (Kcal/mol)			- 2.1					
Entropieänderung ΔS^0 (cal/Grad/mol)	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0		24.0

Tabelle 3: kinetische und thermodynamische Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung

	MELSCHTÄTCHEN-HIRN			
	5	23	30	37
Temperatur °C				
Temperatur °K	276	296	303	310
Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} ($\text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	5.0×10^2	4.4×10^3	9.1×10^3	1.4×10^4
Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} (sec^{-1})	1.7×10^{-6}	1.7×10^{-5}	6.8×10^{-5}	2.6×10^{-4}
Dissoziationskonstante $K_D = k_{-1}/k_{+1}$ (M)	3.4×10^{-9}	3.8×10^{-9}	7.4×10^{-9}	1.8×10^{-8}
Dissoziationskonstante K_D (Scatchard) (M)				2.6×10^{-8}
freie Energie ΔG^0 (Kcal/mol)		- 11.3	- 10.4	- 10.6
Enthalpie unter Standardbedingungen ΔH^0 (Kcal/mol)		- 21.1	- 21.1	- 21.1
Entropieänderung ΔS^0 (cal/Grad/mol)		33.1	35.3	35.9

Tabelle 4: Kinetische und thermodynamische Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung

	RATTE-HIRN			
Temperatur °C	4	18	30	37
Temperatur °K	277	291	303	310
Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} ($\text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	6.9×10^2	3.5×10^3	1.3×10^4	1.7×10^4
Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} (sec^{-1})	1.9×10^{-6}	5.4×10^{-6}	7.6×10^{-5}	3.0×10^{-4}
Dissoziationskonstante $K_D = k_{-1}/k_{+1}$ (M)	2.7×10^{-9}	1.5×10^{-9}	5.8×10^{-9}	1.8×10^{-8}
Dissoziationskonstante K_D (Scatchard) (M)				3.0×10^{-8}
freie Energie ΔG^0 (Kcal/mol)		- 11.7	- 11.4	- 11.0
Enthalpie unter Standardbedingungen ΔH^0 (Kcal/mol)		- 20.5	- 20.5	- 20.5
Entropieänderung ΔS^0 (cal/Grad/mol)		30.2	30.0	30.6

3.1.3.5. Negative Cooperativität der Herzglykosid-Rezeptor-Bindung?

Bei der Dissoziation des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes ergab sich bei den bislang gezeigten Ergebnissen von der Ratte (Skelettmuskel und Hirn, Abb. 29 und 37) und Meerschweinchen (Skelettmuskel, Niere und Hirn, Abb. 31, 32 und 34) in der Dissoziationskurve durch halblogarithmische Auftragung ein gerader Kurvenverlauf bei allen gemessenen Temperaturen. Dies bedeutet, daß das Abdissoziieren des g-Strophanthins von seinem Rezeptor einer Reaktionskinetik 1. Ordnung entspricht:



RS = Rezeptor-Pharmakon-Komplex

R = Rezeptor

S = Pharmakon

k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Bei Ratten-Herz-Membranen (Abb. 39) konnte jedoch keine lineare Abdissoziation entsprechend der Gleichung 4 ermittelt werden. Aus der Abb. 39 ergibt sich, daß die Dissoziation des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes eher einer bimolekularen Reaktion folgt mit einer anfänglich sehr raschen und dann langsamen Dissoziation. Außerdem fällt auf, daß innerhalb von 2 min schon etwa 50% des vorher gebundenen Herzglykosids wieder abdissoziiert sind. Dieses Versuchsergebnis deutet abermals darauf hin, daß das g-Strophanthin möglicherweise mit zwei verschiedenen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten, also wahrscheinlich von zwei verschiedenen Bindungsstellen abdissoziiert. Mit dem Computerprogramm zur Erfassung der Bindungsdaten von zwei verschiedenen Rezeptoren (Weidemann et al., 1970) konnten zwei verschiedene Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten unter der Voraussetzung von zwei verschiedenen von einander unabhängigen Rezeptoren errechnet werden: eine sehr schnelle Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante mit einer $k_{-1} = 1.0 \times 10^{-2} \text{ (sec}^{-1}\text{)}$ und eine wesentlich langsamere Komponente mit einer

$k'_{-1} = 6.0 \times 10^{-4} \text{ (sec}^{-1}\text{)}$. Von der Gesamtbindung betreffen dabei etwa 70% den hochaffinen Rezeptor und etwa 30% den niederaffinen. Aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} und k_{+1} läßt sich die Dissoziationskonstante rechnerisch ermitteln. Die hier aus der schnellen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante und der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante errechnete $K_D = 2.9 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Tabelle 5) stimmt gut überein mit der durch konzentrationsabhängige Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen errechneten Dissoziationskonstante des "hochaffinen" g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes mit einer $K_D = 1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Abb. 25) und ist fast identisch mit der von Sharma und Banerjee (1978) ermittelten Dissoziationskonstante von $K_D = 3.2 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Aus der Abb. 40B ergibt sich, daß bei Meerschweinchen-Herz-Membranen die Abdissoziation des gebundenen g-Strophanthins von seinem Rezeptor offensichtlich ebenfalls einer bimolekularen Reaktion folgt. Wie schon bei Ratten-Herz-Membranen beschrieben, konnten auch hier mit dem Computerprogramm zwei verschiedene Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von zwei verschiedenen von einander unabhängigen Rezeptoren errechnet werden ($k_{-1} = 1.3 \times 10^{-2}$ und $k'_{-1} = 1.3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$). Die schnelle Komponente der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante betrifft hier etwa 90% der Rezeptoren; nach 4 min sind nur mehr 10% des vorher gebundenen g-Strophanthins an seinen Rezeptor gebunden. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes aus dem Quotienten der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten weist wieder eine gute Übereinstimmung aus mit der durch konzentrationsabhängige Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelten $K_D = 1.8 \times 10^{-7} \text{ M}$, sofern man wiederum die schnelle Komponente der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der Berechnung zugrundelegt ($K_D = 2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$, Tabelle 5).

Unter 3.1.3.4. wurden bereits zeit- und temperaturabhängige Effekte auf isolierte Zellmembranen von Ratte und Meerschweinchen beschrieben. Es ist nicht auszuschließen, daß auch hier als Ursache der Krümmung der Dissoziationskurve des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes Änderungen der Membraneigenschaften durch Veränderungen innerhalb der Lipidmatrix der Membran anzusehen

sind. Aber auch andere Erklärungen sind möglich (siehe 3.1.2.), insbesondere ein cooperatives Verhalten. Darunter versteht man, daß die Bindung eines Hormon- oder Pharmakonmoleküls an seinen Rezeptor die Bindung eines weiteren Moleküls erleichtert (positive Cooperativität) oder erschwert (negative Cooperativität). Dabei soll eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins nach erfolgter Bindung eines Pharmakonmoleküls an den Rezeptor die Membraneigenschaft derart beeinflussen, daß die Affinität der noch freien Rezeptoren gegenüber dem Pharmakon zunehmend verändert wird.

Eine der oben beschriebenen Möglichkeiten (zur Erklärung der sich ändernden Rezeptoraffinität) wäre die negative Cooperativität. Diese Erklärungsmöglichkeit wird in letzter Zeit häufig diskutiert (de Meyts und Roth, 1975; Limbird et al., 1975; de Meyts, 1976; Limbird und Lefkowitz, 1976; Lefkowitz, 1976). Eine Möglichkeit, negative Cooperativität unter Pharmakon-Rezeptoren nachzuweisen, besteht darin, die Dissoziation eines Pharmakon-Rezeptor-Komplexes nach Zugabe einer großen Menge eines nicht markierten Pharmakons zu vergleichen mit der Dissoziation des gleichen Pharmakon-Rezeptor-Komplexes nach sehr starker Verdünnung. In diesem Fall nimmt die Anzahl der membran- gebundenen g-Strophanthinmoleküle während der Dissoziation ab, wohingegen im üblichen derartigen Experiment (Zufügen von grossen Mengen nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins zum Pharmakon-Rezeptor-Komplex) ständig alle Membranbindungsstellen besetzt sind. Beim Vorliegen einer negativen Cooperativität sollte bei der Abdissoziation des Pharmakons von seinem Rezeptor (entsprechend der unterschiedlichen Rezeptoraffinität bei unterschiedlicher Rezeptor-Besetzung) ein meßbarer Unterschied bestehen zwischen der Dissoziationsgeschwindigkeit bei niedriger und hoher Rezeptor-Besetzung (de Meyts und Roth, 1975; de Meyts 1976).

Bei Übereinstimmung beider Dissoziationskurven wäre eine negative Cooperativität höchst unwahrscheinlich; bei unterschiedlicher Dissoziationsgeschwindigkeit ist ein negativ cooperatives Verhalten insbesondere dann anzunehmen, wenn nach Zufügen eines nicht radioaktiv markierten Pharmakons eine schnellere Disso-

ziationskinetik meßbar wird. Um eine solche negative Cooperativität für die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor isolierter Zellmembranen aus Rattenherzen zu untersuchen, wurde der Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes nach Zugabe von großen Mengen nicht markierten g-Strophanthins ("chase-experiment") die Dissoziation unter starker Verdünnung 1 : 100 ("dilution-experiment") gegenübergestellt (Abb. 39B). Beim "chase-experiment" erfolgt die Abdissoziation in Gegenwart großer überschüssiger Mengen nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins. Wenn ein radioaktiv markiertes g-Strophanthin-Molekül von seinem Rezeptor abdissoziiert, wird sofort ein anderes (mit höchster Wahrscheinlichkeit) nicht markiertes g-Strophanthin-Molekül gebunden. Auf diese Weise bleiben alle Rezeptoren nach wie vor mit g-Strophanthin besetzt (teils mit tritium-markiertem, teils mit nicht markiertem g-Strophanthin). Da der Rezeptor nicht unterscheidet zwischen markiertem und nicht markiertem g-Strophanthin ist eine Änderung der Beeinflußbarkeit der Rezeptoren untereinander ausgeschlossen, da sich in der Rezeptor-Besetzung nichts geändert hat.

Zur Bestimmung der Dissoziationskinetik durch Verdünnung ("dilution-experiment") wurde die gleiche Menge ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex mit dem gleichen Reaktionsmedium 1 : 100 verdünnt (ohne Zusatz von nicht markiertem g-Strophanthin) und wieder gleichlang zeitabhängig bei 37°C inkubiert. Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes konzentrationsunabhängig. Die Konzentration des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes ist abhängig von den Konzentrationen (nicht Mengen) an ^3H -g-Strophanthin und Rezeptor. Durch Verdünnung der Konzentrationen an ^3H -g-Strophanthin und Herzglykosidrezeptor kommt es also zur Dissoziation des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes. Nach Abdissoziation eines ^3H -g-Strophanthin-Moleküls wird der Rezeptor jetzt nicht mehr von einem anderen g-Strophanthin-Molekül besetzt. Somit sind nach und nach immer weniger Herzglykosidrezeptoren mit einem ^3H -g-Strophanthin-Molekül besetzt, so daß immer weniger Rezeptoren einander beeinflussen können; letztlich sind (im Gegensatz zum "chase-experiment") alle Rezeptoren unbesetzt.

Das entsprechende Experiment (Abb. 39B) zeigt einen identischen Kurvenverlauf und damit gleiche Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten unter den völlig unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. Im ersten Fall wird die Zahl der besetzten Rezeptoren (g -Strophanthin + 3H - g -Strophanthin) konstant und maximal gehalten (im Falle eines negativ kooperativen Verhaltens müßte eine im Vergleich zum "dilution-experiment" höhere Abdissoziation gemessen werden können), im zweiten Fall nimmt die Rezeptor-Besetzung ständig ab (bei Vorliegen einer negativen Kooperativität müßte die Affinität höher sein bei entsprechend langsamerer Dissoziationsgeschwindigkeit). Dieses Ergebnis einer unveränderten Dissoziationsgeschwindigkeit spricht sehr gegen eine negative Kooperativität der Herzglykosidrezeptoren aus Ratten-Herz-Membranen.

Allein aufgrund der bisherigen Ergebnisse und des wahrscheinlichen Ausschlusses des Vorliegens einer negativen Kooperativität darf die Existenz von mindestens zwei von einander unabhängigen Rezeptoren allerdings nicht als bewiesen angesehen werden. Daher muß offenbleiben, ob die langsamen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (und die mit Hilfe der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten daraus errechneten Dissoziationskonstanten: eingeklammerte Werte in Tabelle 5) kinetische Konstanten einer möglicherweise vorliegenden Rezeptor-Subpopulation oder einem wie auch immer gearteten Artefakt entsprechen.

Tabelle 5: Kinetische Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung

	k_{-1} (sec^{-1})	k_{+1} ($\text{Mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_D \text{ (M)}$	$K_D \text{ (M)}$ Äquilibrium
MENSCH ⁺⁺ Herz	3.0×10^{-4}	1.2×10^5	2.5×10^{-9}	2.5×10^{-9}
MEERSCHEINCHEN				
Herz	1.3×10^{-2} (1.3×10^{-3}) ⁺	5.1×10^4	2.5×10^{-7} (2.5×10^{-8}) ⁺⁺	1.8×10^{-7}
Hirn	2.6×10^{-4}	1.1×10^4	1.8×10^{-8}	2.6×10^{-8}
Niere	9.1×10^{-5}	2.5×10^4	3.6×10^{-7}	1.5×10^{-7}
Skelettmuskel	2.5×10^{-3}	5.9×10^4	4.2×10^{-8}	6.2×10^{-8}
RATTE				
Herz	1.0×10^{-2} (6.0×10^{-4}) ⁺	3.4×10^4	2.9×10^{-7} (1.8×10^{-8}) ⁺⁺	1.1×10^{-7}
Hirn	3.0×10^{-1}	1.7×10^4	1.8×10^{-8}	3.0×10^{-8}
Skelettmuskel	0.6×10^{-2}	3.3×10^4	1.8×10^{-7}	1.3×10^{-7}

⁺Kinetische Konstanten einer vermuteten Rezeptor-Subpopulation (siehe 10 und 16)⁺⁺(Erdmann und Hasse, 1975; Erdmann, 1978)

3.2. Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität und g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung

Die spezifische Hemmung der Aktivität der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase durch Herzglykoside ist seit langem bewiesen (Skou, 1965; Schwartz et al., 1975; Erdmann, 1978). Über die Beziehung zwischen der Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor und der gleichzeitigen Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität ergab sich aus früheren Arbeiten (Erdmann und Schoner, 1974; Erdmann et al., 1976a), daß eine Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor gleichzeitig auch eine direkt proportionale Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbaren ATPase bedingt. Diese direkte Korrelation konnte bislang bestätigt werden an verschiedenen Organen von Mensch, Rind, Hund, Katze und Schaf (Erdmann, 1978; Erdmann, 1980). Sie entspricht auch dem Nachweis eines die ganze Zellmembran durchspannenden Proteinmoleküls mit einem Molekulargewicht von etwa 100 000, das sowohl ^3H -g-Strophanthin bindet als auch ATPase-Eigenschaft besitzt (Kyte, 1972; Lane et al., 1973; Peronne et al., 1975; Schuurmans et al., 1976) und dem nachgewiesenen 1:1-Verhältnis zwischen Herzglykosidbindungsstelle und Nukleotidbindungsstelle der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase (Erdmann et al., 1976a). Wenn dieses Prinzip allgemeingültig sein soll, dann müßte sich diese strenge 1:1-Korrelation zwischen der Herzglykosidbindung und dem entsprechenden Effekt (Enzymhemmung) auch an den relativ digitalisresistenten Spezies Ratte und Meerschweinchen zeigen lassen können.

In den bislang beschriebenen Versuchen sind die Dissoziationskonstanten des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes der einzelnen Organe und damit auch jene freien g-Strophanthin-Konzentrationen ermittelt worden, bei denen 50% der jeweiligen Rezeptoren mit g-Strophanthin besetzt sind. Eine halbmaximale Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbaren ATPase aus den verschiedenen Organen durch der K_D entsprechende g-Strophanthin-Konzentrationen entspräche der erwarteten Korrelation.

Die durch g-Strophanthin konzentrationsabhängig induzierte Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-aktivierbaren ATPase aus den einzelnen Organen ist auf den Abb. 41 - 48 dargestellt.

- Abb. 41: Ratten-Hirn
- Abb. 42: Meerschweinchen-Hirn
- Abb. 43: Ratten-Niere
- Abb. 44: Meerschweinchen-Niere
- Abb. 45: Ratten-Skelettmuskel
- Abb. 46: Meerschweinchen-Skelettmuskel
- Abb. 47: Ratten-Herz
- Abb. 48: Meerschweinchen-Herz

Zur Messung der halbmaximalen Hemmung wurde jeweils zunächst die Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase bestimmt (optisch-enzymatisch-gekoppelter Test nach Schoner et al., 1967), dann g-Strophanthin zugegeben und die Hemmung gesondert für jede g-Strophanthin-Konzentration registriert. Nach 5 - 8 min nach Zugabe von g-Strophanthin war der der jeweiligen g-Strophanthin-Konzentration entsprechende maximale Hemmeffekt erreicht.

Bei diesem Verfahren werden in der Regel geringgradig höhere g-Strophanthin-Konzentrationen für die halbmaximale Hemmung ermittelt als nach Vorinkubation in 3 mM MgCl_2 und 3 mM Imidazol/ PO_4 . Das Inkubationsmedium im optisch-enzymatisch-gekoppelten Test enthält Ammoniumchlorid. Ammoniumionen verhalten sich gegenüber der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase wie K^+ -Ionen. Auch sie verdrängen g-Strophanthin von seinem Rezeptor, so daß in Gegenwart von Ammoniumionen zum Erreichen des gleichen prozentualen Hemmeffektes eine etwas höhere g-Strophanthin-Konzentration nötig ist. Um diesen Ammonium-Effekt zu eliminieren, wurde eine ausreichend große Menge Zellmembranen in jenem Inkubationsmedium inkubiert, das für die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor Verwendung findet (siehe 2.2.2.3.). An Stelle von ^3H -g-Strophanthin wurde g-Strophanthin in jener gewünschten Konzentration eingesetzt, deren Hemmeffekt auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbare ATPase gemessen werden soll. Die erforderliche Inkubationszeit wurde der jeweiligen zeitabhängigen Bindungskurve von ^3H -g-Strophanthin entnommen. Nach Erreichen des Äquilibriums wurde ein aliquoter Anteil dieses Inkubates in den optisch-enzymatisch-gekoppelten Test eingebracht, der die gleiche molare g-Strophanthin-Konzentration enthielt. Wenn jetzt die Anfangsaktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase des zuge-

setzten Zellmembraninkubates gemessen wird, kann der anfangs sehr geringe Ammoniumeffekt vernachlässigt werden. Durch dieses Verfahren wird die konzentrationsabhängige Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase unter Äquilibriumbedingungen gemessen. Die im weiteren Verlauf der Hemmungskurve zu beobachtende Aktivierung des Enzyms hat als Ursache den Ammoniumeffekt (Verdrängung des g -Strophanthins vom Rezeptor). Daraus resultiert oftmals eine geringe Linksverschiebung der Hemmungskurve unter Äquilibriumbedingungen (wie z.B. in Abb. 41). Das bedeutet, daß die halbmaximale Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase jetzt bereits bei etwas niedrigeren g -Strophanthin-Konzentrationen eintritt.

Aus den Abb. 41 - 48 ergibt sich die jeweilige g -Strophanthin-Konzentration für die halbmaximale Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase der verschiedenen Organe. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Ein unmittelbarer Vergleich dieser halbmaximalen Hemmkonzentrationen mit den organentsprechenden Dissoziationskonstanten des g -Strophanthin-Rezeptor-Komplexes ist nicht möglich. Die halbmaximale Hemmkonzentration I_{50} gibt die Gesamtkonzentration an freiem und gebundenem g -Strophanthin an, die zur halbmaximalen Hemmung führt. Die Dissoziationskonstante hingegen ist gleichbedeutend mit der freien Pharmakonzentration, bei der 50% der Rezeptoren mit dem Pharmakon besetzt sind. Ein direkter Vergleich ist nur dann möglich, wenn Bindung und Hemmung bei identischen Rezeptor-Konzentrationen gemessen werden (Erdmann und Schoner, 1974).

Tabelle 6: Halbmaximale Hemmkonzentrationen der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase (I_{50}) M

	MEERSCHWEINCHEN	RATTE
Herz	5.0×10^{-7}	4.0×10^{-5}
Hirn	2.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}
Niere	5.0×10^{-7}	4.0×10^{-5}
Skelettmuskel	7.5×10^{-8}	2.5×10^{-5}

Bei Meerschweinchen-Herzmembranen ergibt sich bei identischen Rezeptorkonzentrationen eine Übereinstimmung zwischen der Bindung von ^3H -g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor ($K_D = 1.8 \times 10^{-7} \text{ M}$) und der halbmaximalen Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase ($I_{50} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ M}$) im selben Größenordnungsbereich. In Abb. 49 wurde der Bindung die entsprechende Hemmung direkt gegenübergestellt. Diese graphische Darstellung verdeutlicht, daß die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbare ATPase aus Meerschweinchen-Herzmembranen erst zu etwa 20% gehemmt ist, obwohl schon etwa 50% der Herzglykosidrezeptoren mit g-Strophanthin besetzt sind. Diese Diskrepanz könnte noch interpretiert werden als experimentelle Fehlerbreite.

Am Beispiel der Ratten-Herzmembranen wird die Nichtübereinstimmung zwischen den Konzentrationen, die die 50%ige Rezeptorbesetzung und die halbmaximale Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase bewirken, noch deutlicher (Abb. 50). In Abb. 50A sind die Bindungsdaten einer konzentrationsabhängigen Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Herzmembranen nach Scatchard aufgetragen. Die gleichen Bindungsdaten sind in Abb. 50B in % der maximalen Bindung in Abhängigkeit von der g-Strophanthin-Konzentration enthalten. Das Diagramm zeigt außerdem die Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase in % des Maximaleffektes ebenfalls in Abhängigkeit von der g-Strophanthin-Konzentration. Aus der graphischen Darstellung ergibt sich eine deutliche Diskrepanz zwischen Bindung und Hemmung bei identischer Rezeptor-Konzentration. Bei dieser Auftragsweise wären bei einer g-Strophanthin-Konzentration von $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ etwa 50% der Herzglykosidrezeptoren mit g-Strophanthin besetzt, aber nur etwa 10% der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase gehemmt.

Trägt man aber nur die mit Hilfe des Computerprogramms errechneten Daten des hochaffinen Rezeptors aus Abb. 50A gegen die g-Strophanthin-Konzentration auf (Abb. 50C), so wird der Unterschied zwischen Bindung und Hemmung noch deutlicher. Jetzt ergibt sich, daß bei einer g-Strophanthin-Konzentration kleiner als 10^{-6} M bereits die gesamte Bindungskapazität des hochaffinen Rezeptors abgesättigt ist, während bei dieser Konzentration praktisch keine Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase zu messen ist.

Um Einflüsse unterschiedlicher Methoden auf diese Versuchsergebnisse auszuschließen und Bindung und Hemmung unter identischen Bedingungen zu vergleichen, wurden Membranen in einem weiteren Experiment mit radioaktiv markiertem g-Strophanthin (Konzentrationsbereich 3.2×10^{-9} M bis 10^{-3} M) inkubiert. Nach Ablauf der erforderlichen Inkubationszeit wurde aus jedem Konzentrationsansatz ein Teil des Inkubates zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Bindung an den Herzglykosidrezeptor entnommen und abfiltriert und ein weiterer Teil zur Messung der jeweiligen ATPase-Aktivität in den optisch-enzymatisch-gekoppelten Test eingebracht. Auch unter diesen identischen Vorinkubationsbedingungen zeigt sich bei entsprechender Auftragungsweise (Abb. 51) die gleiche Diskrepanz zwischen Bindung und Hemmung bei fast identischen g-Strophanthin-Konzentrationen im Vergleich zu Abb. 50C.

Dieses Ergebnis bedeutet, daß bei Ratten-Herz-Membranen die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor nicht mit einer gleichzeitigen Hemmung der $(Na^{+}+K^{+})$ -aktivierbaren ATPase gekoppelt ist. Im Vergleich dazu würde bei der Auftragung der Bindungsdaten des niederaffinen Rezeptors und Fortlassen der hochaffinen Bindungskapazität (aus Abb. 50A) eine Annäherung der Verlaufskurven und damit eher eine Übereinstimmung zwischen Bindung und Hemmung zu sehen sein.

Die halbmaximale Bindung an den Herzglykosidrezeptor und die 50%ige Hemmung der $(Na^{+}+K^{+})$ -aktivierbaren ATPase im Bereich von 4×10^{-5} M würde zwar sehr gut übereinstimmen mit den Ergebnissen von Fricke et al. (1975), die den halbmaximal positiv inotropen Effekt für g-Strophanthin an Ratten-Herzen im Bereich von 2.5×10^{-5} M gefunden haben. Ein solches Ergebnis würde aber gleichzeitig bedeuten, daß - von der g-Strophanthin-Konzentration her gesehen - der hochaffine Herzglykosidrezeptor im Ratten-Herz dann offensichtlich nicht für den positiv inotropen Effekt verantwortlich ist, daß vielmehr eher der niederaffine Rezeptor mit dem positiv-inotropen Effekt korreliert. Dies stimmt mit den vorgelegten Ergebnissen der Kontraktionsversuche (Abb. 52) aber in keiner Weise überein.

3.3. g-Strophanthin-Effekt und ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung

3.3.1. Effekt von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft schlagender Ventrikelstreifen

Da auch an der als "digitalisresistent" bekannten Ratte ein positiv inotroper Effekt unter g-Strophanthin gemessen wurde (Fricke et al., 1975), war es naheliegend zu untersuchen, bei welchen Konzentrationen diese Zunahme der Kontraktionskraft auftritt. Insbesondere, ob dann auch die g-Strophanthin-Konzentration für den halbmaximal-positiv inotropen Effekt mit jener g-Strophanthin-Konzentration korreliert, bei der 50% der Herzglykosidrezeptoren mit g-Strophanthin besetzt sind. Wenn man einmal von der Existenz von zwei verschiedenen von einander unabhängigen Rezeptoren entsprechend den Herzglykosidbindungsdaten an isolierten Herzmembranen ausgeht, sollte es sich zeigen, mit welchem der beiden Rezeptoren dann der positiv inotrope Effekt gekoppelt ist.

Die Kontraktionskraft wurde an schlagenden Ventrikelstreifen gemessen. Wegen der geringeren Wanddicke wurde dazu der rechte Ventrikel des Rattenherzens in maximal 1 mm breite Streifen geschnitten und in einer Tyrode-Lösung mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch gereizt. Bei fortlaufender Registrierung wurde nach einer Äquilibrationsphase von 60 min dem Inkubationsmedium g-Strophanthin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Um Summations- und/oder Ermüdungseffekte auszuschließen, wurde für jede g-Strophanthin-Konzentration ein neuer Ventrikelstreifen verwendet.

Die zeit- und konzentrationsabhängigen Effekte sind in Abb. 52 zusammengefaßt. Ohne g-Strophanthin nimmt die Kontraktionskraft innerhalb von 60 min um etwa 20% ab. Mit g-Strophanthin nimmt die Kontraktionskraft konzentrationsabhängig zu mit einem Maximaleffekt bei einer Konzentration von 3×10^{-5} M. Zugleich fällt auf, daß das Maximum des Effektes mit steigenden Konzentrationen immer schneller eintritt und nach einem initialen Peak dann im weiteren Verlauf wieder leicht abnimmt. Ein ganz

ähnlicher Effekt zeigt sich auch in den Versuchen von Fricke et al. (1975). Bei noch höheren Konzentrationen als 3×10^{-5} M traten regelmäßig Arrhythmie und/oder Kontraktur auf als Hinweise für eine Vergiftung des Muskels. Aus diesen Messungen läßt sich eine Konzentrations-Wirkungskurve für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin am Ratten-Herz erstellen (Abb. 53). Dazu wurde den konzentrationsabhängigen Verlaufskurven jeweils das Maximum des Effektes entnommen und in % des maximal erzielbaren Effektes gegen die g-Strophanthin-Konzentration aufgetragen. Die Kurve weist aus, daß sich die positive Inotropie S-förmig dem Maximum nähert und offensichtlich bei einer g-Strophanthin-Konzentration von 3×10^{-5} M das Maximum des Effektes auch weitgehend erreicht ist. Aus diesem Diagramm ergibt sich, daß die halbmaximale Zunahme der Kontraktionskraft am Ratten-Herz bei einer g-Strophanthin-Konzentration von etwa 3×10^{-7} M eintritt. Dieser Wert stimmt überein mit jener freien g-Strophanthin-Konzentration, bei der 50% der Rezeptoren mit g-Strophanthin besetzt sind (Dissoziationskonstante K_D). Die Übereinstimmung zeigt sich auch an den Bindungsdaten des hochaffinen Rezeptors (Abb. 25 und 50) und auch durch Errechnung der Dissoziationskonstante aus der schnellen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} und Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} (Abb. 39 und Tabelle 5).

3.3.2. Bindung von ^3H -g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor schlagender Ventrikelstreifen

Wenn g-Strophanthin in diesen Konzentrationen (10^{-7} M bis 3×10^{-5} M) positiv inotrop wirkt, dann muß es sich auch an den Herzglykosidrezeptor binden, wenn der Herzglykosidrezeptor für die positive Inotropie verantwortlich ist. Diese spezifische g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung sollte auch am schlagenden Ventrikelstreifen durch Verwendung radioaktiv markierten g-Strophanthins nachgewiesen werden können.

Dazu wurden Ventrikelstreifen unter identischen Versuchsbedingungen nach Äquilibrierung mit ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Die

der jeweiligen g-Strophanthin-Konzentration entsprechende Inkubationszeit wurde den Konzentrations- und zeitabhängigen Verlaufskurven der Abb. 52 entnommen. Als Inkubationszeit wurde der Zeitpunkt des jeweiligen Maximaleffektes angenommen. Die Daten dieser Bindung von ^3H -g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor schlagender Ventrikelstreifen sind in Abb. 54 aufgetragen.

Einer Sättigungskinetik folgend erreicht die Bindungskurve ein Plateau (Abb. 54A). Das bedeutet wiederum, daß auch bei Überschuß von freiem g-Strophanthin in der Inkubationslösung nicht mehr gebunden wird. In Abb. 54B sind die gleichen Bindungsdaten nach Scatchard aufgetragen. Durch die Meßpunkte läßt sich eine Gerade ziehen, d.h., auch bei steigenden g-Strophanthin-Konzentrationen haben alle Rezeptoren im gemessenen Konzentrationsbereich die gleiche Affinität gegenüber g-Strophanthin unabhängig von der jeweiligen g-Strophanthin-Konzentration. Aus dem Anstieg der Geraden errechnet sich die Dissoziationskonstante von $K_D = 3.0 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Es kann somit auf die Übereinstimmung der g-Strophanthin-Konzentration für die halbmaximale Rezeptorbindung und den halbmaximal positiv inotropen Effekt verwiesen werden, beides gemessen an schlagenden Ventrikelstreifen der Ratte unter identischen Versuchsbedingungen. Weiterhin ergibt sich aus diesen Versuchen, daß nur der hochaffine Rezeptor mit der gemessenen und auch errechneten Dissoziationskonstanten im Bereich von $K_D = 3 \times 10^{-7} \text{ M}$ mit dem positiv inotropen Effekt gekoppelt ist.

Die an isolierten Zellmembranen ermittelten Bindungsstellen mit hoher Bindungskapazität und geringer Bindungsaffinität entsprechen somit wahrscheinlich einem während der Membranpräparation entstandenen Artefakt durch Konformationsänderung der Membran. Oder aber es sind Bindungsstellen für g-Strophanthin, die dann nicht mit der Zunahme der Kontraktionskraft in Zusammenhang stehen und am schlagenden Herzmuskel nicht nachweisbar sind. Der Gedanke an einen Artefakt ist jedoch näherliegend, da sich an Ratten-Skelettmuskel-Membranen zeigen ließ, daß sich die Affinität zeitabhängig ändert (Abb. 24) (Erdmann et al., 1976b).

Inkubiert man jedoch schlagende Muskelstreifen aus dem Musculus soleus der Ratte in Tyrode-Lösung unter identischen Versuchsbedingungen wie bei den Herzmuskelstreifen mit ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins, so erhält man ebenfalls eine Gerade in der Scatchard-Auftragung der Bindungsdaten (Abb. 55), aus deren Anstieg sich die Dissoziationskonstante nur eines einheitlichen Rezeptors ergibt ($K_D = 3.8 \times 10^{-7} \text{ M}$). Diese Daten stimmen mit ähnlichen Untersuchungen am Musculus soleus der Ratte von Clausen und Hansen (1974 und 1977) überein.

Andererseits muß kritisch darauf hingewiesen werden, daß die halbmaximale Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase und die halbmaximale Hemmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme (siehe nächster Abschnitt 3.4.) im Bereich von 10^{-5} M liegen. In diesem Bereich befindet sich auch die Dissoziationskonstante für die niederaffine Bindungsstelle an isolierten Herzmuskelzellmembranen (und auch die Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes aus Ratten-Nieren-Membranen). Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, ob sich eventuell mit anderer Methodik eine niederaffine Bindungsstelle für Herzglykoside nachweisen läßt, die nicht mit dem positiv inotropen Effekt sondern mit der Hemmung des aktiven $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -Transportes verknüpft ist (Okita, 1973; Okita, 1975; Okita, 1977).

3.4. Effekt von g-Strophanthin auf den transmembranösen Ionentransport in schlagenden Ventrikelstreifen

Da sich aus den Bindungsexperimenten mit isolierten Zellmembranen ergeben hat, daß am Rattenherz die Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase erst bei höheren Konzentrationen meßbar wird als der positiv inotrope Effekt, war es naheliegend zu untersuchen, wie sich die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbare ATPase im schlagenden Ventrikelstreifen unter identischen Versuchsbedingungen in Gegenwart von g-Strophanthin verhält. Die ATPase-Aktivität selbst läßt sich in einem Ventrikelstreifen nur sehr schwer messen, da für eine ausreichende Membranpräparation zu wenig Ausgangsgewebe vorliegt und die ATPase-Präparation sehr lange dauert.

Außerdem muß aufgrund der bisherigen Untersuchungen an isolierten Zellmembranen damit gerechnet werden, daß sich während der Membranpräparation Konformationsänderungen auch an der Membran-ATPase auswirken, die die Korrelation mit dem Eintritt des positiv inotropen Effektes auch dann als ungewiß erscheinen läßt, falls sich eine Übereinstimmung finden läßt. Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität ist nur an Membranpräparationen, d.h. an zerstörten Zellbestandteilen meßbar.

Es sollte geklärt werden, ob in vivo eine vergleichbare (50%) Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase schon bei jener g -Strophanthin-Konzentration auftritt, bei der der halbmaximal positiv inotrope Effekt eintritt. Eine Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase muß eine Hemmung des transmembranösen Ionentransportes nach sich ziehen, da dieses Enzym die biochemische Basis des aktiven Na^+/K^+ -Transportes darstellt (Skou, 1965). Als Ausdruck der gehemmten Pumpfunktion der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase sollte sich dabei unter g -Strophanthin konzentrationsabhängig eine Verminderung des transmembranösen aktiven Ionentransportes von Na^+ und K^+ zeigen lassen.

Transmembranöse Ionenflüsse lassen sich durch Verwendung von Isotopen messen, wobei allerdings die Messung von $^{42}\text{K}^+$ wegen der kurzen Halbwertszeit technisch sehr schwierig ist. Als Kalium-Analogen wird deshalb häufig das Rubidium-Isotop verwendet, da $^{86}\text{Rb}^+$ beim Transport von der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase sehr ähnlich wie K^+ transportiert wird und somit Messungen des Rubidium-Transportes den Kaliumfluß durch die Membran gut wiedergeben (Yamamoto et al., 1979).

3.4.1. Aufnahmekinetik von $^{86}\text{Rb}^+$ in schlagende Ventrikelseifen aus Rattenherzen

Der aktive transmembranöse und durch g -Strophanthin hemmbare Ionentransport ist Ausdruck der ATPase-Aktivität, wobei sich die Aktivität auf die transportierte Menge Kalium bzw. Rubidium pro Zeiteinheit bezieht. Bei gleichbleibender Aktivität der ATPase (Konstanthaltung von Temperatur und Substratkonzentration) wird der Hineintransport von $^{86}\text{Rb}^+$ in die Zelle initial pro

Zeiteinheit gleich sein. Die intrazelluläre Anreicherung von $^{86}\text{Rb}^+$ erfolgt dabei in einer initialen Phase linear so lange, bis aufgrund einer steigenden intrazellulären $^{86}\text{Rb}^+$ -Konzentration allmählich ein zunehmender passiver $^{86}\text{Rb}^+$ -Auswärtsstrom zu einer Angleichung der intra- und extrazellulären spezifischen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aktivität führt. Der transmembranöse Einwärts-Ionenfluß von $^{86}\text{Rb}^+$ als Ausdruck der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität läßt sich somit nur in der initialen linearen Transportphase messen. $^{86}\text{Rb}^+$ wurde in den hier beschriebenen Versuchen nur als Tracer (Bereich nanomolar) zugesetzt unter der Voraussetzung, daß es von der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase genauso wie K^+ transportiert wird.

In der Abb. 57 wird der Nachweis erbracht, daß die intrazelluläre Aufnahme von $^{86}\text{Rb}^+$ in schlagende Ventrikelstreifen aus Rattenherzen bis zu 60 min einer linearen Aufnahmekinetik folgt. Als weitere Kriterien eines aktiven Transportes wurde außerdem nachgewiesen, daß die transportierte $^{86}\text{Rb}^+$ -Menge direkt proportional dem Gewicht der Ventrikelstreifen erfolgt, daß eine aktive intrazelluläre Aufnahme über denaturierte Membranen nicht zustandekommt und daß der $^{86}\text{Rb}^+$ -Transport durch einen spezifischen Hemmstoff (g-Strophanthin) gehemmt werden kann. Die in hitzedenaturierten Ventrikelstreifen (Vorinkubation in begaster Tyrode-Lösung während 60 min bei 80°C) meßbare Radioaktivität lag weit unterhalb jener Radioaktivität, die in einer gewichtsmäßig vergleichbaren Menge $^{86}\text{Rb}^+$ -enthaltender Inkubations-Lösung meßbar war. Nicht denaturierte, intakte Ventrikelstreifen zeigen dagegen eine Anreicherung der Radioaktivität um den Faktor 2-3 bei gleicher Inkubationszeit.

3.4.2. Intrazelluläre Aufnahme von ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$) unter g-Strophanthin

Ein spezifischer Hemmstoff der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase und des aktiven Na^+/K^+ -Transportes (Skou, 1973; Schwartz et al., 1975) ist g-Strophanthin. Um den Effekt von g-Strophanthin auf den aktiven transmembranösen Ionentransport in schlagenden Ventrikelstreifen zu untersuchen, wurden Ventrikelstreifen der Ratte in Tyrode-Lösung äquilibriert und anschließend mit

g-Strophanthin in steigenden Konzentrationen vorinkubiert. Die der jeweiligen g-Strophanthin-Konzentration entsprechende Inkubationszeit wurde den konzentrations- und zeitabhängigen Verlaufskurven der Abb. 52 entnommen. Als Inkubationszeit wurde wieder der Zeitpunkt des Eintritts des jeweiligen Maximaleffektes angenommen. Nach Ablauf dieser zeitlich unterschiedlichen Einwirkzeit von g-Strophanthin wurde $^{86}\text{Rb}^+$ zugegeben. Die dann einheitlich nach 10 min in den Ventrikelstreifen enthaltene Radioaktivität wurde gemessen. Die Inkubationszeit von 10 min für $^{86}\text{Rb}^+$ wurde gewählt, um sicher im linearen Bereich der Aufnahmekinetik zu messen (Abb. 57).

Die Daten des g-Strophanthin-Effektes auf den transmembranösen Ionentransport sind in Abb. 58 enthalten. Aus der vorhandenen Konzentration des nicht markierten K^+ und des $^{86}\text{Rb}^+$ läßt sich die jeweils transportierte Menge ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$) in Nanomolen angeben. Diese Art der Auftragung wurde der einfachen $^{86}\text{Rb}^+$ -Auftragung vorgezogen aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander und mit anderen Autoren (Yamamoto et al., 1979). Dabei muß noch berücksichtigt werden, daß die in die Ventrikelstreifen aufgenommene Menge ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$) der intra- und interzellulären Aufnahme entspricht. Der Inulinraum wurde in Übereinstimmung mit der Literatur (Lüllmann et al., 1975) mit 53% bestimmt (siehe 2.3.5.).

Aus der Abb. 58 ergibt sich, daß eine Hemmung der transmembranösen Ionenflüsse erst ab einer g-Strophanthin-Konzentration größer als 10^{-5} M eintritt. Bei 10^{-3} M g-Strophanthin ist der maximale Hemmeffekt erreicht. Aus dem Verlauf der Hemmungskurve ergibt sich der halbmaximale Effekt von g-Strophanthin auf die Ionenflüsse im Bereich von 4×10^{-5} M g-Strophanthin. Aus der Identität der halbmaximalen Hemmkonzentrationen von 4×10^{-5} M g-Strophanthin für die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität aus isolierten Zellmembranen und für den aktiven transmembranösen Transport von ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$) wird deutlich, daß am Rattenherz die Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-aktivierbaren ATPase}$ erst bei sehr viel höheren Konzentrationen meßbar wird als der positiv inotrope Effekt mit 3×10^{-7} M g-Strophanthin.

Offensichtlich ist für den positiv inotropen Effekt von *g*-Strophanthin auf die Kontraktionskraft des Rattenherzens eine meßbare Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase nicht erforderlich, da bei jener *g*-Strophanthin-Konzentration, bei der der halbmaximal positiv inotrope Effekt eintritt ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$) noch keine Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase bzw. der aktiven $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme nachzuweisen ist.

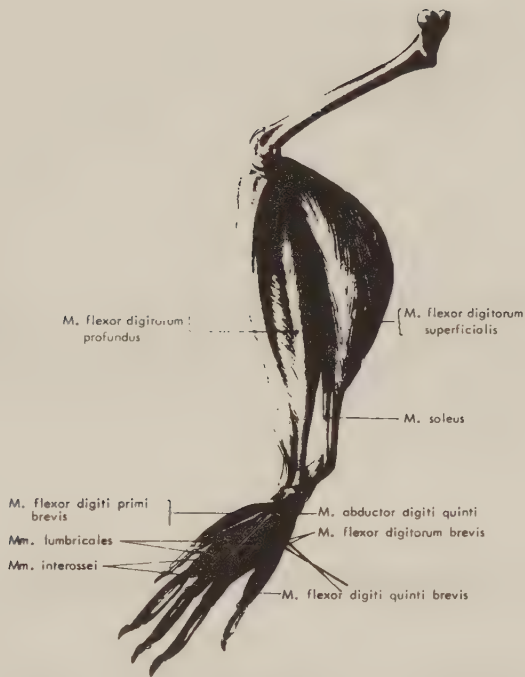


Abb. 1

Ratte: Muskeln der Hinterextremität (Unterschenkel und Fuß, mediale Ansicht); Hömig (1970)

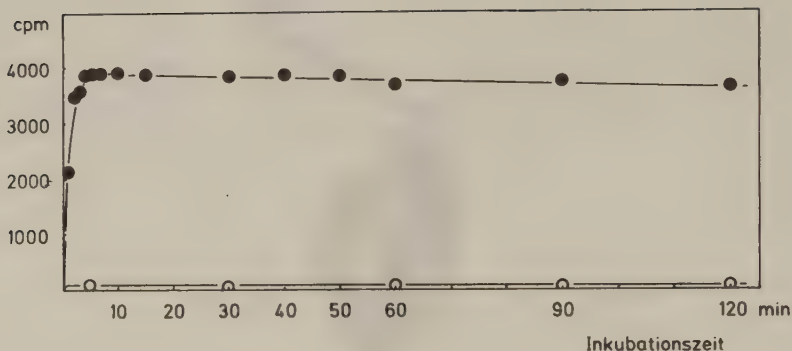


Abb. 2

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Herz-Membranen

Herzmuskelzellmembranen (0.39 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.26 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.
- ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

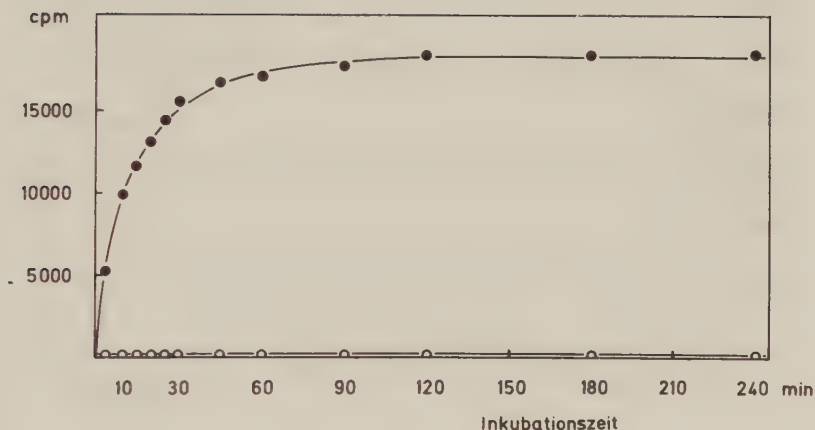


Abb. 3

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Hirn-Membranen

Hirnzellmembranen (0.7 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.57 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.
- ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

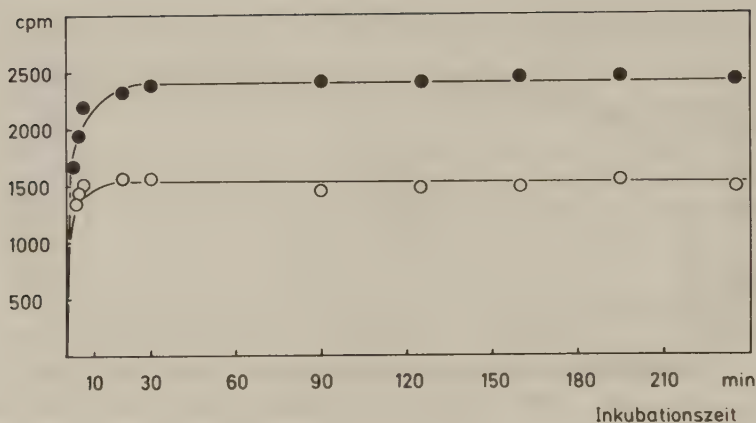


Abb. 4

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Erythrozyten-Membranen

Erythrozytenmembranen (entsprechend 1.0 ml Blut mit etwa 5×10^9 Erythrozyten) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.3, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde (nach raschem Abzentrifugieren) das überschüssige nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin im Überstand abgegossen. Die proteingebundene Radioaktivität im Sediment wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.
- ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

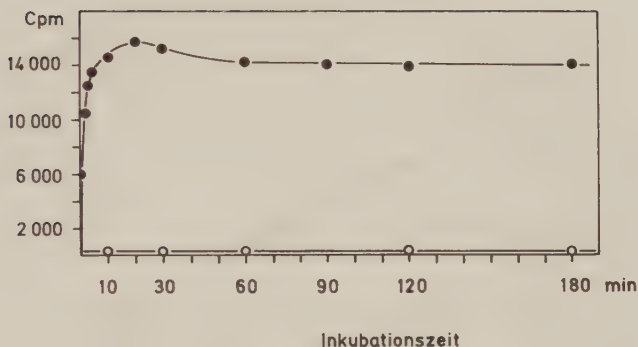


Abb. 5

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Nieren-Membranen

Nierenzellmembranen (0.23 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase-Aktivität } 1.15 \text{ U/mg Protein}$) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und $4 \times 10^{-9} \text{ M } ^3\text{H-g-Strophanthin}$ inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene $^3\text{H-g-Strophanthin}$ mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- Gesamtbindung von $^3\text{H-g-Strophanthin}$ an die Membranen.
- $^3\text{H-g-Strophanthin}$ -Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

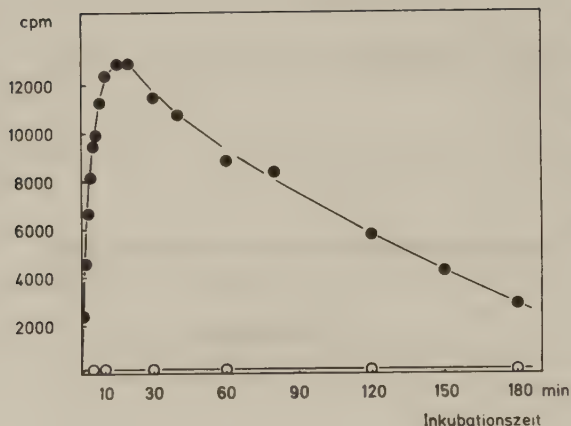


Abb. 6

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Skelettmuskel-Membranen

Skelettmuskelzellmembranen (0.52 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.2 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.
- ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

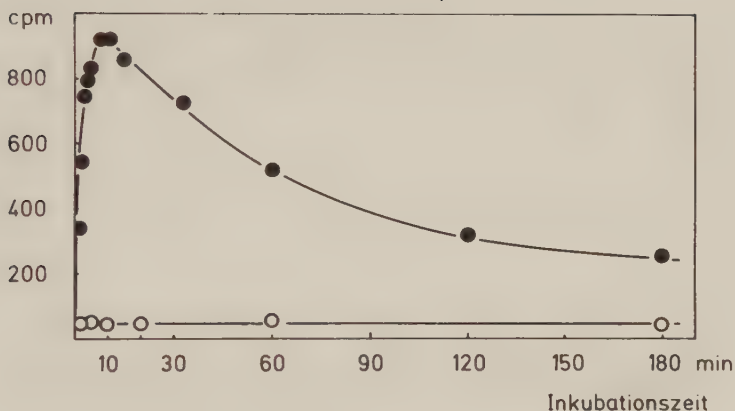


Abb. 7

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Herz-Membranen

Herzmuskelzellmembranen (0.69 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.25 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.
- ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

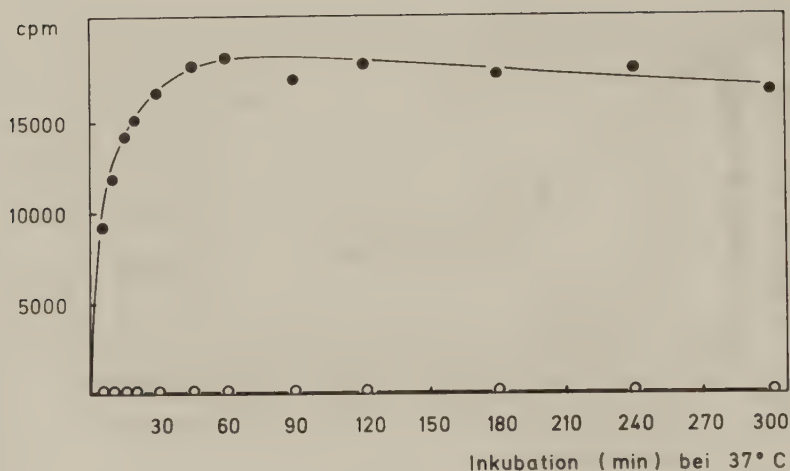


Abb. 8

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Hirn-Membranen

Hirnzellmembranen (0.52 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 1.0 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

●—● Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.

○—○ ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

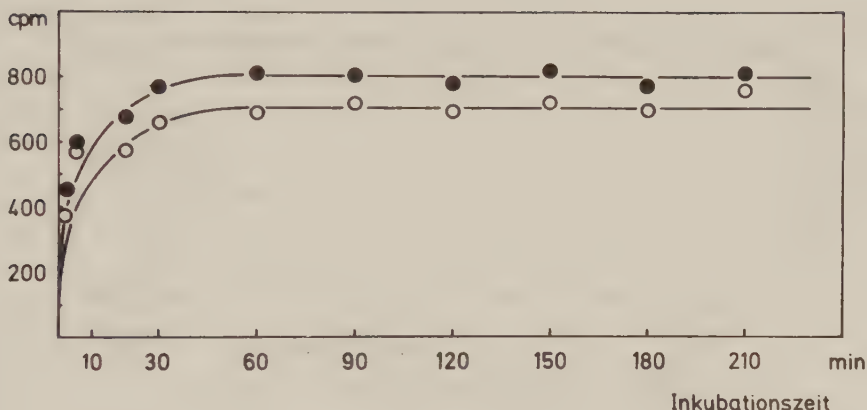


Abb. 9

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Erythrozyten-Membranen

Erythrozytenmembranen (entsprechend 1.0 ml Blut) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.3, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach raschem Abzentrifugieren wurde das überschüssige nicht gebundene ^3H -g-Strophanthin im Überstand abgegossen. Die proteingebundene Radioaktivität im Sediment wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.
- ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

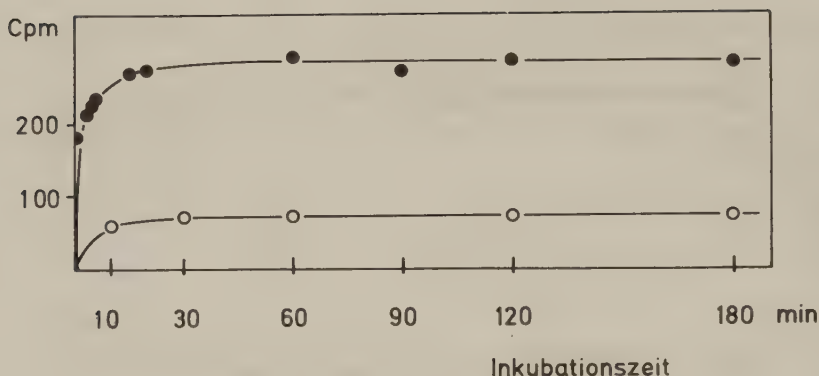


Abb. 10

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Nieren-Membranen

Nierenzellmembranen (0.2 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 3.7 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- — ● Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.
- — ○ ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

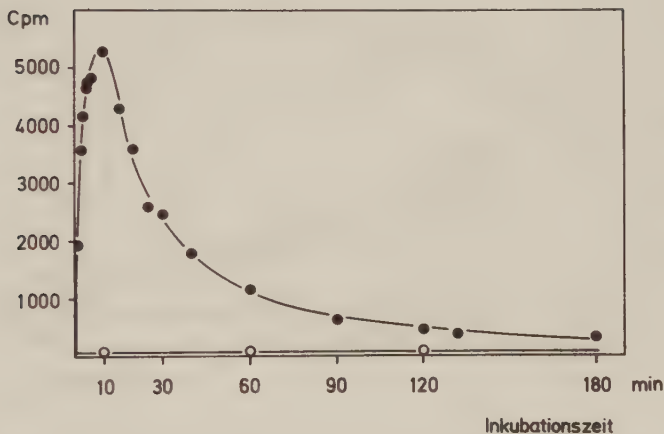


Abb. 11

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Skelettmuskel-Membranen

Skelettmuskelzellmembranen (1.5 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.
- ^3H -g-Strophanthin-Bindung in Gegenwart von 10^{-3} M nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins (unspezifische Bindung siehe 2.2.3.5.).

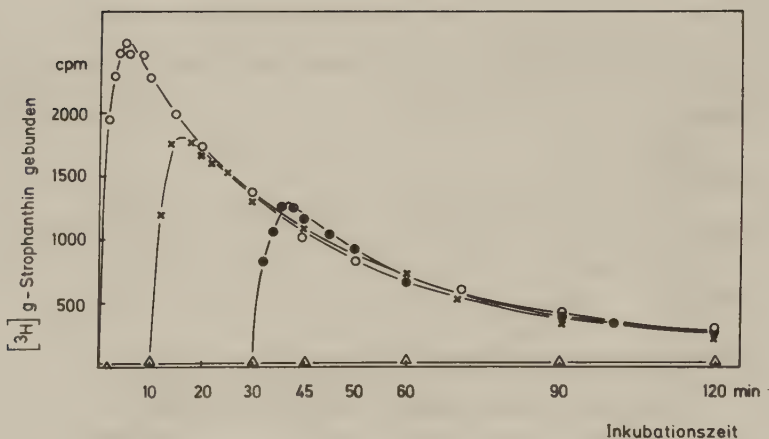


Abb. 12

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Skelettmuskel-Membranen

Skelettmuskelzellmembranen (0.38 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.).

- o—o Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen.
- x—x Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen nach Vorinkubation der Membranen während 10 min bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 und 3 mM Imidazol/ PO_4 .
- Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen nach Vorinkubation der Membranen während 30 min bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 und 3 mM Imidazol/ PO_4 .
- Δ—Δ Unspezifische Bindung = Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Membranen in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins (siehe 2.2.3.5.).

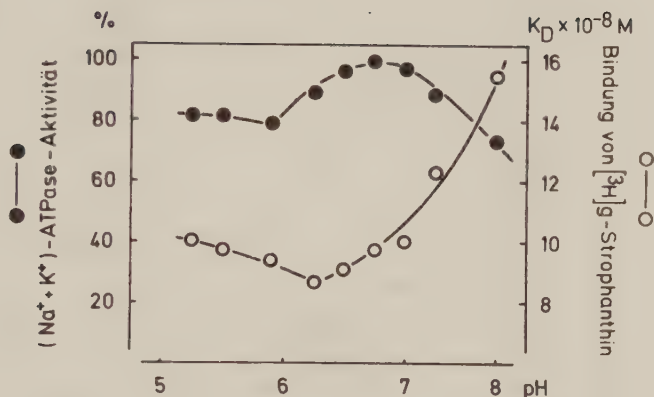


Abb. 13

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Skelettmuskel-Membranen und Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in Abhängigkeit vom pH-Wert

○—○ Skelettmuskelzellmembranen (0.4 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden bei 37°C 4 min lang in 50 mM Imidazol/HCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (2.5×10^{-8} M bis 2.5×10^{-6} M) nicht markierten g-Strophanthins bei verschiedenen pH-Werten (HCl-gepuffert) inkubiert.

Gesamtvolumen 2.0 ml.

Messung der proteingebundenen Radioaktivität nach 2.2.3.3. und Bestimmung der unspezifischen Bindung nach 2.2.3.5.

●—● Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität wurde bei den verschiedenen pH-Werten nach 2.2.2. bestimmt.

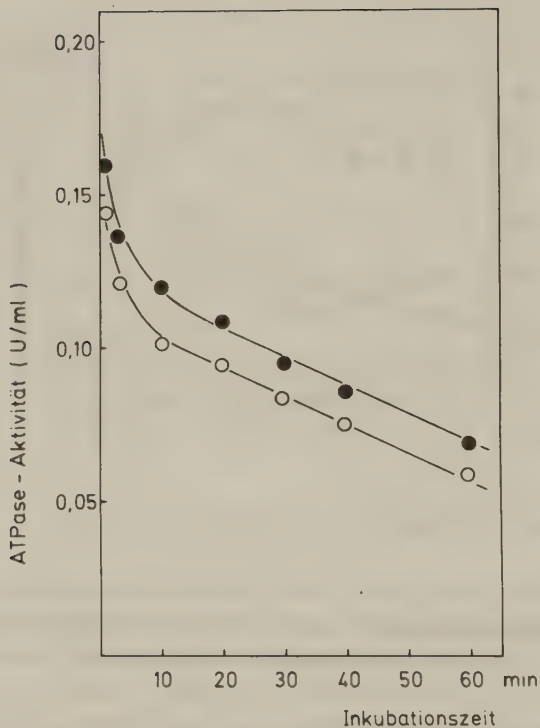


Abb. 14

Zeitabhängigkeit der Aktivität der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase aus Ratten-Herz-Membranen

Herzmuskelzellmembranen (3.5 mg Protein; ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität 0.25 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 5 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 und 3 mM Imidazol/ PO_4 inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Zu den angegebenen Zeiten wurde aus einem aliquoten Teil dieses Inkubates mit Hilfe des optisch-gekoppelten Testes die ATPase-Aktivität gemessen (siehe 2.2.2.4.).

- Gesamt-ATPase-Aktivität
- ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität

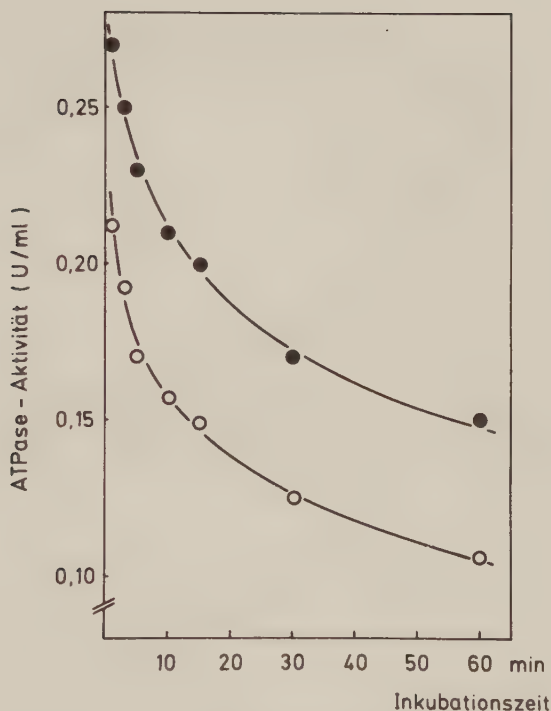


Abb. 15

Zeitabhängigkeit der Aktivität der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase aus Ratten-Skelettmuskel-Membranen

Skelettmuskelzellmembranen (1.6 mg Protein; ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 und 3 mM Imidazol/ PO_4 inkubiert. Gesamtvolumen 4.0 ml.

Zu den angegebenen Zeiten wurden aus einem aliquoten Teil dieses Inkubates mit Hilfe des optisch-gekoppelten Testes die ATPase-Aktivität gemessen (siehe 2.2.2.4.)

●—● Gesamt-ATPase-Aktivität
○—○ ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität

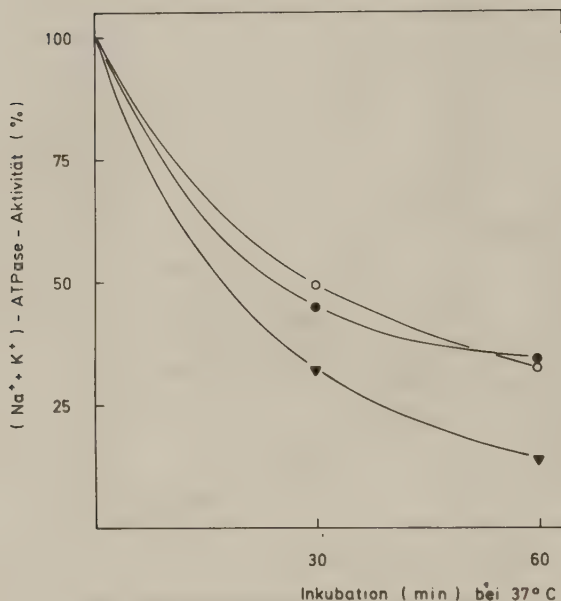


Abb. 16

Zeitabhängigkeit der Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase aus Ratten-Skelettmuskel-Membranen

Skelettmuskelzellmembranen (2.0 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und folgenden Zusätzen inkubiert (Gesamtvolumen 2.0 ml):

○—○ 5 mM Imidazol/HCl pH 7.25

●—● 1 mg Trypsin-Inhibitor

▼—▼ 10.000 E Aprotinin (Trasylol^R Fa. Bayer, Leverkusen)

Zu den angegebenen Zeiten wurde aus einem aliquoten Teil dieses Inkubates mit Hilfe des optisch-gekoppelten Testes die ATPase-Aktivität gemessen.

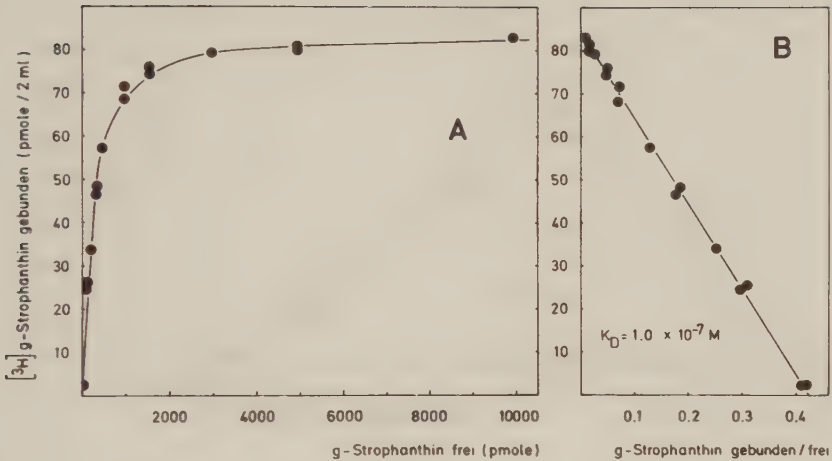


Abb. 17

Bindung von ³H-g-Strophanthin an Meerschweinchen-Nieren-Membranen

Nierenzellmembranen (0.23 mg Protein; (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität 1.15 U/mg Protein) wurden 25 min lang bei 37°C in 5 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM Imidazol/PO₄, 4 × 10⁻⁹ M ³H-g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (5.0 × 10⁻⁸ M bis 5.0 × 10⁻⁶ M) nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren mit Hilfe von Glasfaserfiltern gestoppt. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.).

Die unspezifische Bindung von ³H-g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10⁻³ M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

Die Bindungsdaten der Abb. 4 sind in Abb. B nach Scatchard aufgetragen.

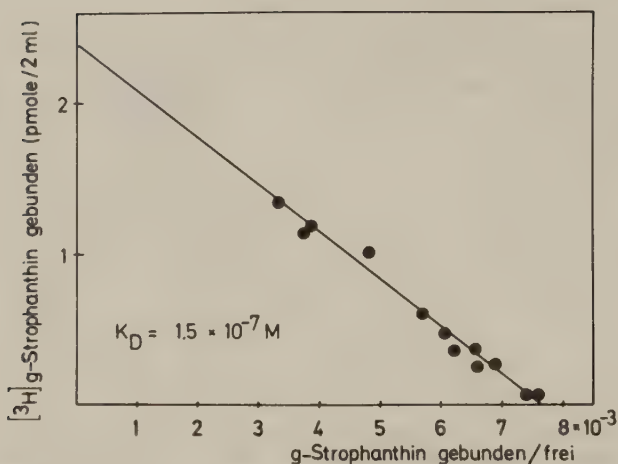


Abb. 18

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Erythrozyten-Membranen

Die in 1.0 ml Blut enthaltenen Erythrozyten wurden 180 min lang bei 37°C in 5 mM Imidazol/HCl pH 7.3, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen ($5.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ bis $2.0 \times 10^{-7} \text{ M}$) nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch Abzentrifugieren beendet. Die Radioaktivität im Sediment wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.), die Bindungsdaten wurden nach Scatchard aufgetragen.

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an der Zellmembran wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

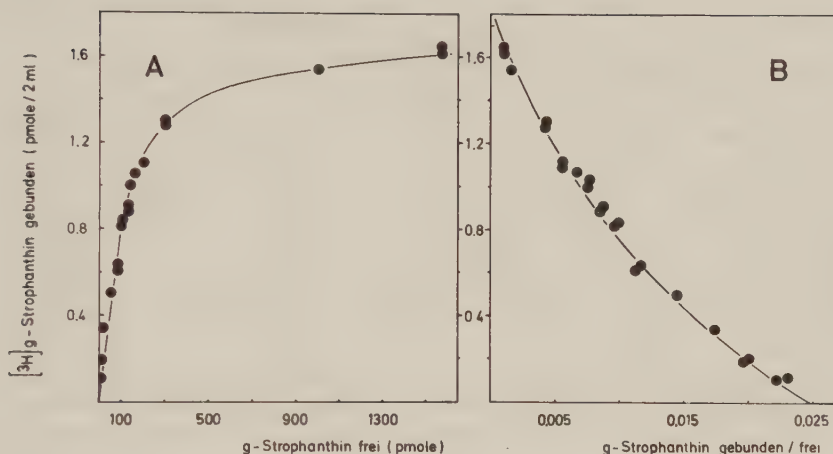


Abb. 19

Bindung von ³H-g-Strophanthin an Meerschweinchen-Hirn-Membranen

Hirnzellmembranen (0.15 mg Protein; (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Aktivität 0.47 U/mg Protein) wurden 120 min lang bei 37°C in 5 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl₂, 3 mM Imidazol/PO₄, 3 x 10⁻⁹ M ³H-g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (2.5 x 10⁻⁹ M bis 8.0 x 10⁻⁷ M) nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren mit Hilfe von Glasfaserfiltern gestoppt. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.).

Die unspezifische Bindung von ³H-g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10⁻³ M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

Die Bindungsdaten der Abb. A sind in Abb. B nach Scatchard aufgetragen.

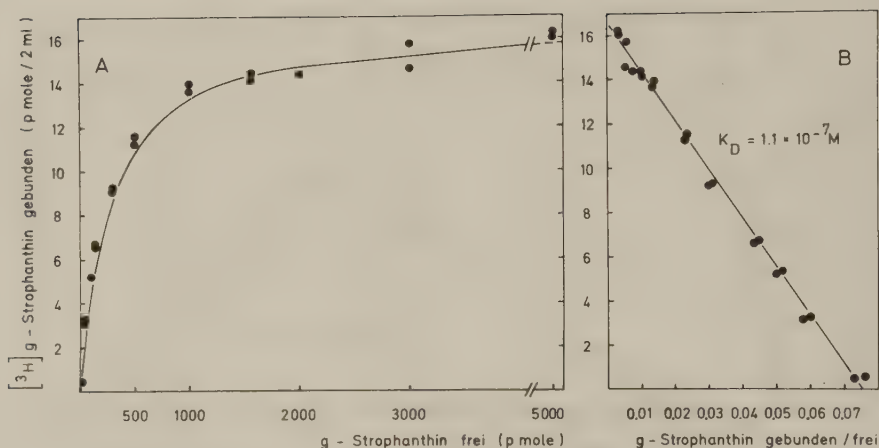


Abb. 20

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Herz-Membranen

Herzmuskelzellmembranen (0.39 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.26 U/mg Protein) wurden 8 min lang in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen ($2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ bis $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren mit Hilfe von Glasfaserfiltern gestoppt. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.).

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

Die Bindungsdaten der Abb. A sind in Abb. B nach Scatchard aufgetragen.

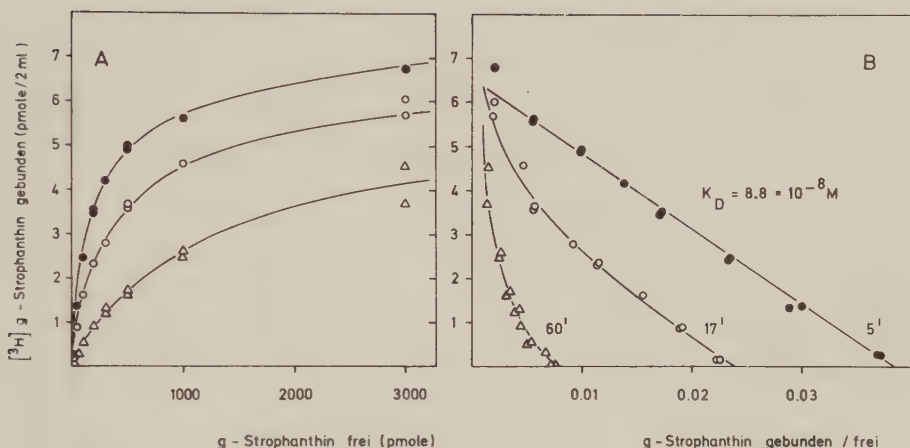


Abb. 21

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Skelettmuskel-Membranen

Skelettmuskelzellmembranen (0.52 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.05 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 5 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen ($2 \times 10^{-8} \text{ M}$ bis $1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) nicht markierten g-Strophanthins unterschiedlich lange inkubiert (Gesamtvolumen 2.0 ml):

●—● Inkubationszeit 5 min

○—○ Inkubationszeit 17 min

△—△ Inkubationszeit 60 min

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren mit Hilfe von Glasfaserfiltern gestoppt. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.).

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

Die Bindungsdaten der Abb. A sind in Abb. B nach Scatchard aufgetragen.

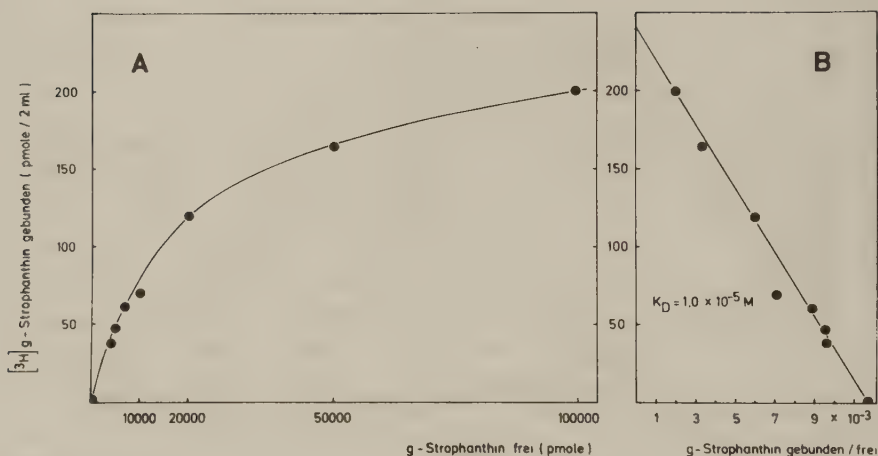


Abb. 22

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Nieren-Membranen

Nierenzellmembranen (0.97 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 3.4 U/mg Protein) wurden 60 min lang bei 37°C in 5 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen ($2 \times 10^{-6} \text{ M}$ bis $5 \times 10^{-5} \text{ M}$) nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren mit Hilfe von Glasfaserfiltern gestoppt. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.).

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

Die Bindungsdaten der Abb. A sind in Abb. B nach Scatchard aufgetragen.

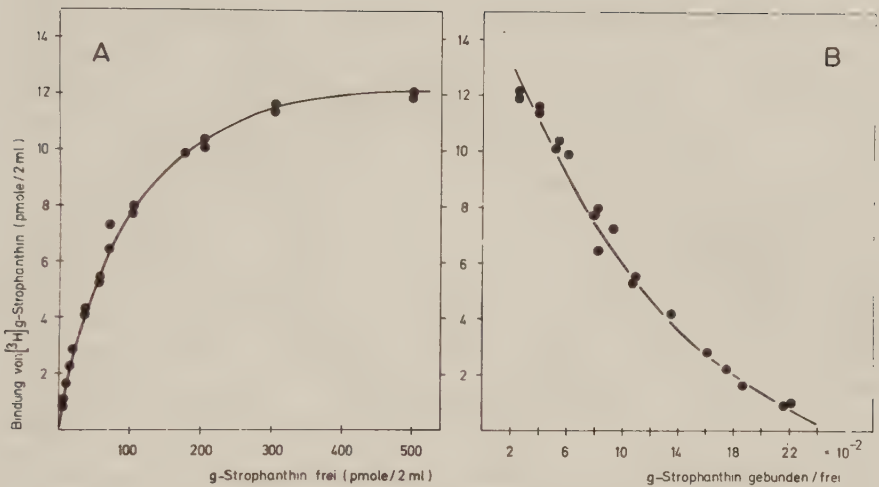


Abb. 23

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Hirn-Membranen

Hirnzellmembranen (0.18 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.5 U/mg Protein) wurden 120 min lang bei 37°C in 5 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 3×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (2.5×10^{-9} M bis 2.5×10^{-7} M) nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren mit Hilfe von Glasfaserfiltern gestoppt. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.).

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

Die Bindungsdaten der Abb. A sind in Abb. B nach Scatchard aufgetragen.

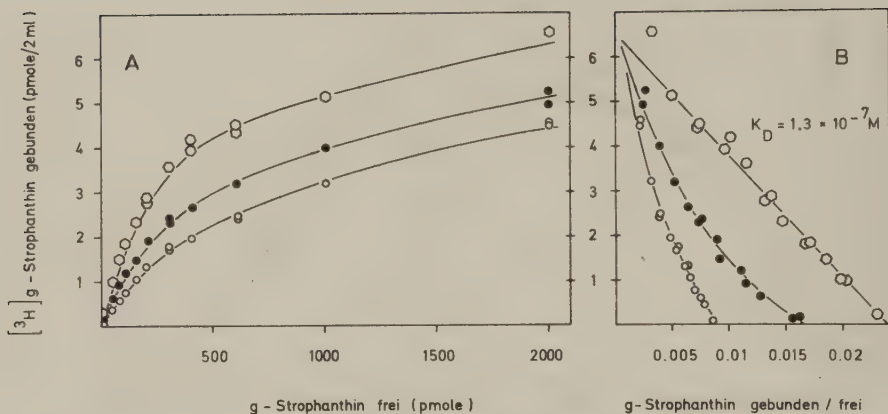


Abb. 24

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Skelettmuskel-Membranen

Skelettmuskelzellmembranen (1.0 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $5.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen ($2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ bis $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$) nicht markierten g-Strophanthins unterschiedlich lang inkubiert (Gesamtvolumen 2.0 ml):

- Inkubationszeit 2 min
- Inkubationszeit 4 min
- Inkubationszeit 10 min

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren mit Hilfe von Glasfaserfiltern gestoppt. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.).

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

Die Bindungsdaten der Abb. A sind in Abb. B nach Scatchard aufgetragen.

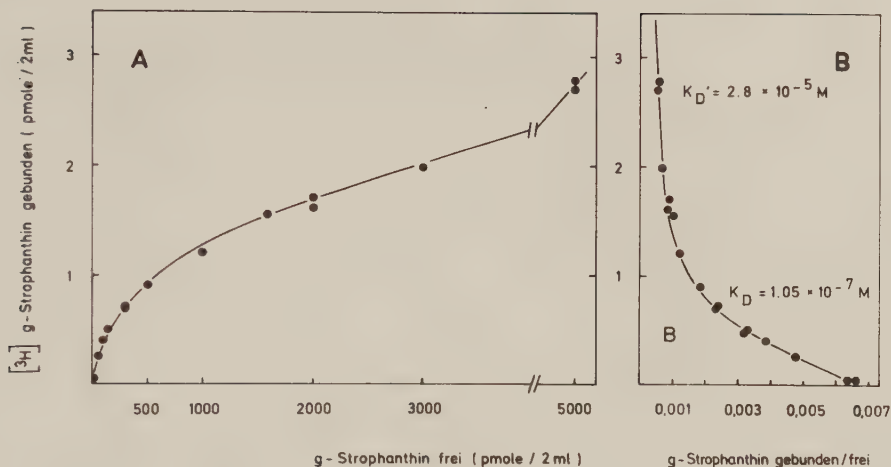


Abb. 25

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Herz-Membranen

Herzmuskelzellmembranen (0.3 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.25 U/mg Protein) wurden bei 37°C 5 min lang in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins ($2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ bis $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert, die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.). Die unspezifische ^3H -g-Strophanthin-Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

A: Durch die Auftragung des gebundenen ^3H -g-Strophanthins gegen die freie g-Strophanthin-Konzentration zeigt sich, daß mit steigenden g-Strophanthin-Konzentrationen immer mehr g-Strophanthin gebunden wird. Die Bindung folgt keiner echten Sättigungskinetik.

B: In der Scatchard-Auftragung der gleichen Bindungsdaten ergibt sich ein gekrümmter Kurvenverlauf. Durch graphische Approximation nach Weidemann et al. (1970) können die Dissoziationskonstanten für mindestens 2 verschiedene Rezeptoren errechnet werden.

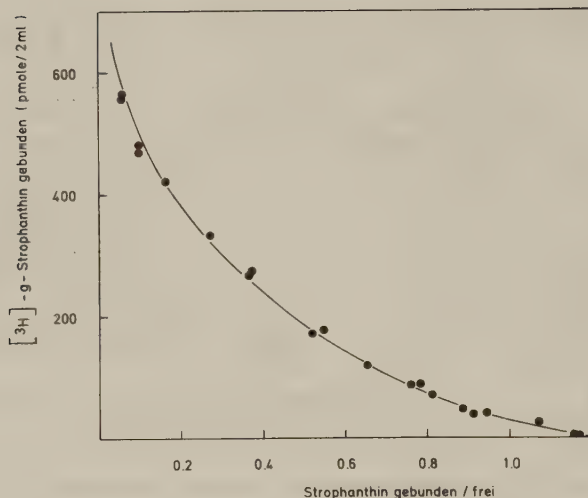


Abb. 26

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Hirn-Membranen

Hirnzellmembranen (0.7 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.57 U/mg Protein) wurden 120 min bei 37°C in 5 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 2×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (5×10^{-9} M bis 5×10^{-6} M) nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren mit Hilfe von Glasfaserfiltern gestoppt. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.).

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

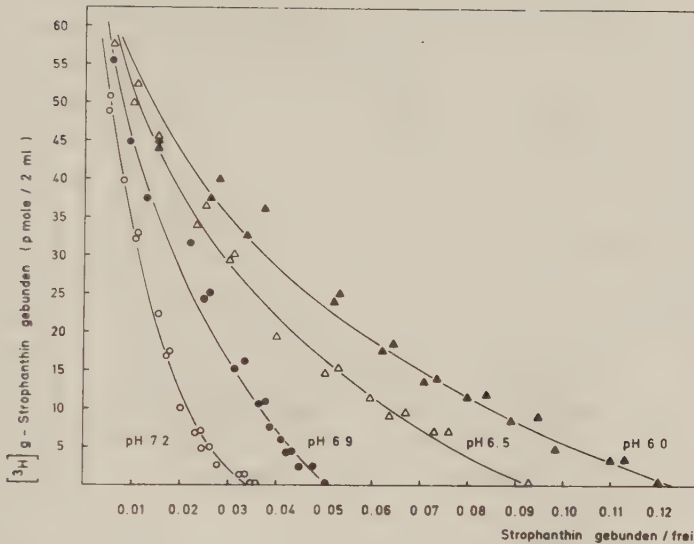


Abb. 27

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Hirn-Membranen bei verschiedenen pH-Werten

Hirnzellmembranen (0.05 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.9 U/mg Protein) wurden 60 min lang bei 37°C in 5 mM Imidazol/HCL, 3 mM MgCl_2 , 5 mM Imidazol/ PO_4 , 2×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (1.5×10^{-8} M bis 5×10^{-6} M) nicht markierten g-Strophanthins bei den in der Abbildung angegebenen pH-Werten inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren mit Hilfe von Glasfaserfiltern gestoppt. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.).

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

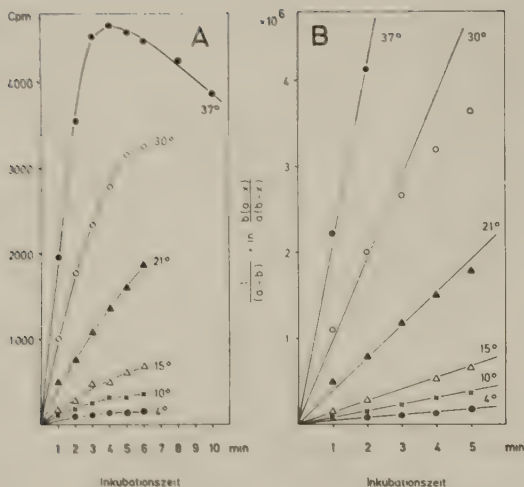


Abb. 28

Assoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes aus Ratten-Skelettmuskel-Membranen

Skelettmuskelzellmembranen (1.5 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden bei den angegebenen Temperaturen in 50 mM Imidazol/HCl, pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 5.5×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

- A: Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde zu den angegebenen Zeiten mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die membrangebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.3.) und zeitabhängig aufgetragen (in cpm).
- B: Diese Bindungsdaten sind in Abb. B in eine Reaktionsgleichung für Reaktionen 2. Ordnung eingesetzt (Gleichung 2). Aus dem initial linearen Kurvenverlauf kann aus der Steigung der Geraden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} errechnet werden, wobei
- a = g-Strophanthin-Anfangskonzentration (5.5 nM)
 - b = Anfangskonzentration des freien Rezeptors (10.5 nM)
 - x = Menge des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes zur Zeit t (sec)

Die jeweils unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins gemessen (siehe 2.2.3.5.).

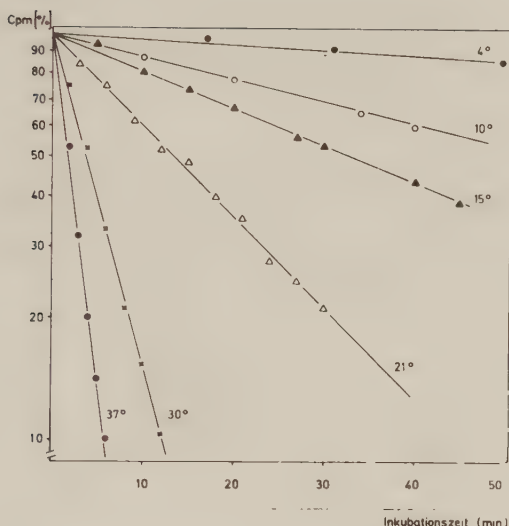


Abb. 29

Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes aus Ratten-Skelettmuskel-Membranen

Skelettmuskelzellmembranen (105 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden bei 37°C 10 min lang in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 5.5×10^{-7} M ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die ^3H -g-Strophanthin-Membranen durch rasches Abzentrifugieren von überschüssigem nicht gebundenem ^3H -g-Strophanthin abgetrennt (siehe 2.2.4.1.).

Das Sediment wurde unter Eiswasserkühlung in 20 ml Imidazol/HCl 0.1 M pH 7.25 homogenisiert. Ein aliquoter Anteil dieser ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (Protein 1 mg) wurde in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 10^{-3} M nicht markiertem g-Strophanthin bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Zu den verschiedenen Zeiten wurde die dann noch membrangebundene Radioaktivität rasch abfiltriert und gemessen (siehe 2.2.4.2.).

Als unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde die nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37°C noch meßbare Radioaktivität bezeichnet.

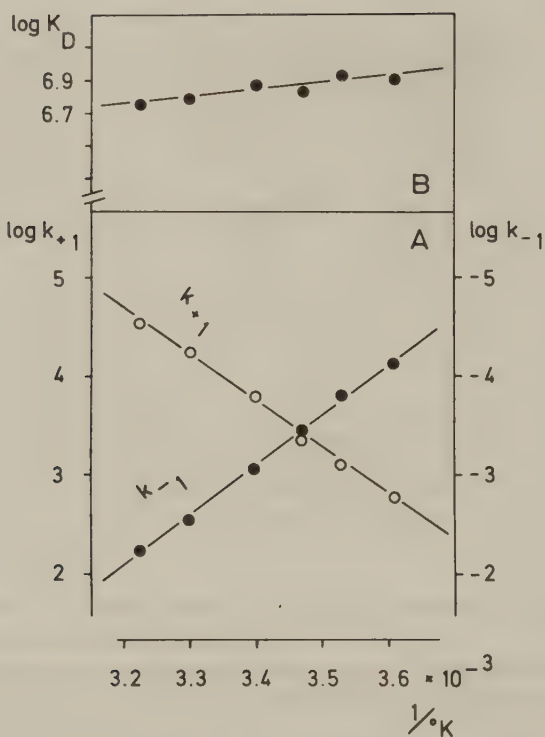


Abb. 30

Arrhenius-Auftragung der Assoziations- und Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur
- Rattenskelettmuskelmembranen -

- A: Die jeweiligen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten $\circ\text{---}\circ$ der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung wurden aus der Steigung der entsprechenden linearen Assoziationskurven der Abb. 28B errechnet.
Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten $\bullet\text{---}\bullet$ der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung wurden aus den linearen Zerfallskurven der Abb. 29 bestimmt.
- B: Auftragung der reziproken Gleichgewichtskonstanten ($1/K_D$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

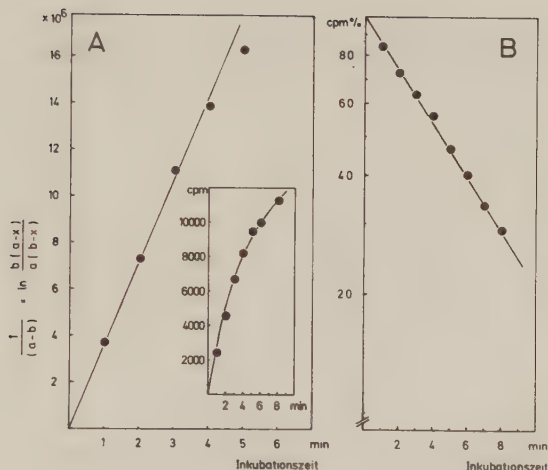


Abb. 31

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Skelettmuskel-Membranen

A: Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

Skelettmuskelzellmembranen (0.54 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.2 U/mg Protein; Rezeptor-Konzentration 13 nM) wurden bei 37°C unterschiedlich lang in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml (siehe 2.2.3.1.). Die Bindungsdaten wurden in die Reaktionsgleichung für Reaktionen 2. Ordnung eingesetzt und aus der Steigung der Geraden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante errechnet.

B: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Skelettmuskelzellmembranen (10.4 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.2 U/mg Protein) wurden bei 37°C 13 min lang in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 80 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe isoliert (siehe 2.2.4.1.). Das Sediment wurde in 4.0 ml 0.1 M Imidazol/HCl pH 7.25 homogenisiert. Aliquote Anteile dieser ^3H -g-Strophanthin-Membranen (Protein 1 mg) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. In Minutenabständen wurde die dann noch jeweils membrangebundene Radioaktivität gemessen. Aus der Neigung der Geraden wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} errechnet. Die unspezifische Bindung wurde gemessen nach 2.2.3.5. und 2.2.4.2.1.

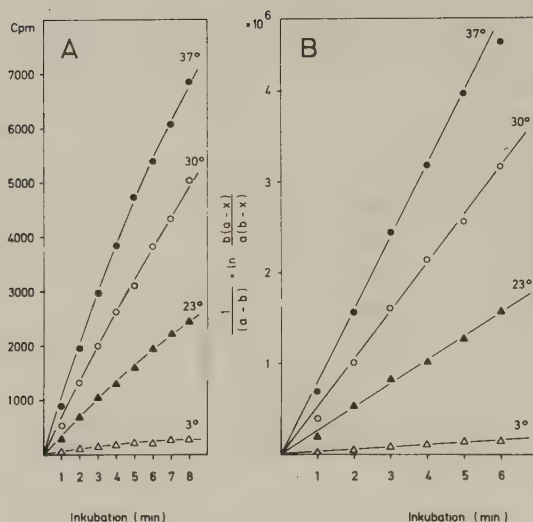


Abb. 32

Assoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Meerschweinchen-Hirn-Membranen

Hirnzellmembranen (0.39 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ Aktivität 0.53 U/mg Protein; Rezeptor-Konzentration 13.3 nM) wurden bei den angegebenen Temperaturen in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 5.5 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

- A: Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde zu den angegebenen Zeiten mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die membrangebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.) und zeitabhängig aufgetragen (in cpm).
- B: Diese Bindungsdaten sind in Abb. B in eine Reaktionsgleichung für Reaktionen 2. Ordnung eingesetzt (Gleichung 2). Aus dem initial linearen Kurvenverlauf kann aus der Steigung der Geraden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} errechnet werden, wobei
- a = g-Strophanthin-Anfangskonzentration (5.5 nM)
 - b = Anfangskonzentration des freien Rezeptors (13.3 nM)
 - x = Menge des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes zur Zeit t (sec)

Die jeweils unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins gemessen (siehe 2.2.3.5.).

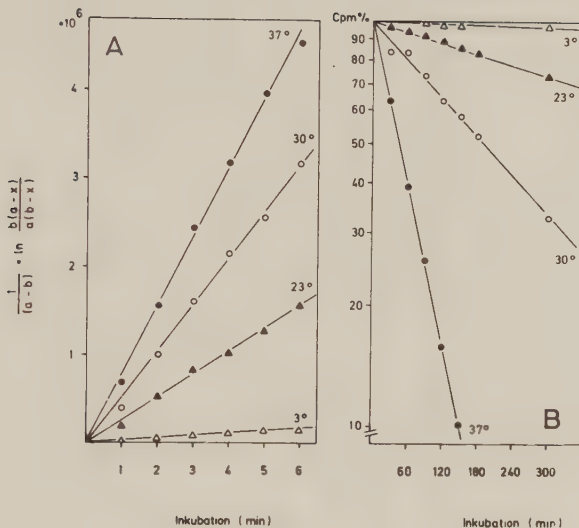


Abb. 33

Assoziation und Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Meerschweinchen-Hirn-Membranen

A: Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} (siehe Abb. 32)

B: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1}

Hirnzellmembranen (21 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.43 U/mg Protein) wurden bei 37°C 120 min lang in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 110 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe durch Abzentrifugieren vom überschüssigen ^3H -g-Strophanthin abgetrennt (siehe 2.2.4.1.).

Das Sediment wurde in 5.0 ml 0.1 M Imidazol/HCl pH 7.25 homogenisiert. Aliquote Anteile dieser ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (Protein 0.7 mg) wurden bei den angegebenen Temperaturen in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Die nach den angegebenen Zeiten jeweils noch vorhandene membrangebundene Radioaktivität wurde gemessen (siehe 2.2.4.2.).

Aus der Neigung der linearen Zerfallskurven wurde die jeweilige Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} errechnet. Ermittlung der unspezifischen Bindung nach 2.2.3.5. und 2.2.4.2.1.

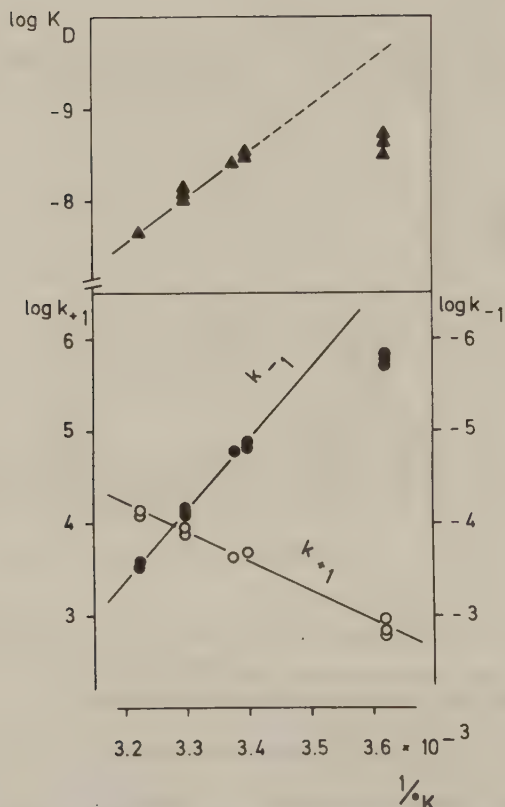


Abb. 34

Arrhenius-Auftragung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur
- Meerschweinchenhirnmembranen -

- A: Die jeweiligen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten o—o der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung wurden aus der Steigung der entsprechenden linearen Assoziationskurve der Abb. 32 errechnet.
Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten ●—● der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung wurden aus der linearen Zerfallskurve der Abb. 33B ermittelt.
- B: Auftragung der reziproken Gleichgewichtskonstanten ($1/K_D$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

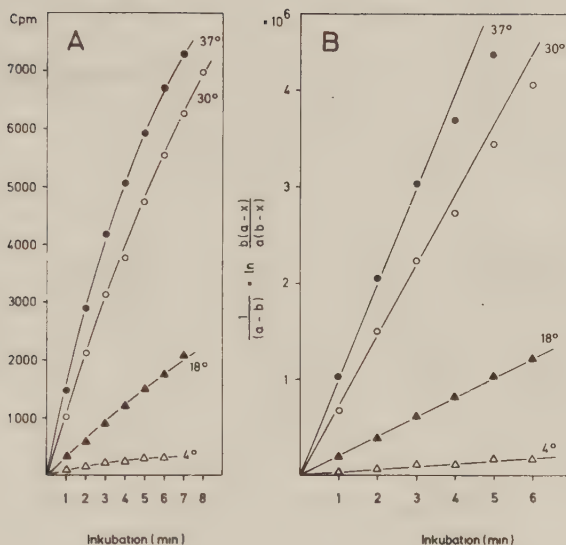


Abb. 35

Assoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Ratten-Hirn-Membranen

Hirnzellmembranen (0.27 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.71 U/mg Protein; Rezeptor-Konzentration 12.6 nM) wurden bei den angegebenen Temperaturen in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 5.5 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

A: Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde zu den angegebenen Zeiten mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die membrangebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.) und zeitabhängig aufgetragen (in cpm).

B: Diese Bindungsdaten sind in Abb. B in eine Reaktionsgleichung für Reaktionen 2. Ordnung eingesetzt (Gleichung 2). Aus dem initial linearen Kurvenverlauf kann aus der Steigung der Geraden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} errechnet werden, wobei

a = g-Strophanthin-Anfangskonzentration (5.5 nM)

b = Anfangskonzentration des freien Rezeptors (12.6 nM)

x = Menge des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes zur Zeit t (sec)

Die jeweils unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins gemessen (siehe 2.2.3.5.).

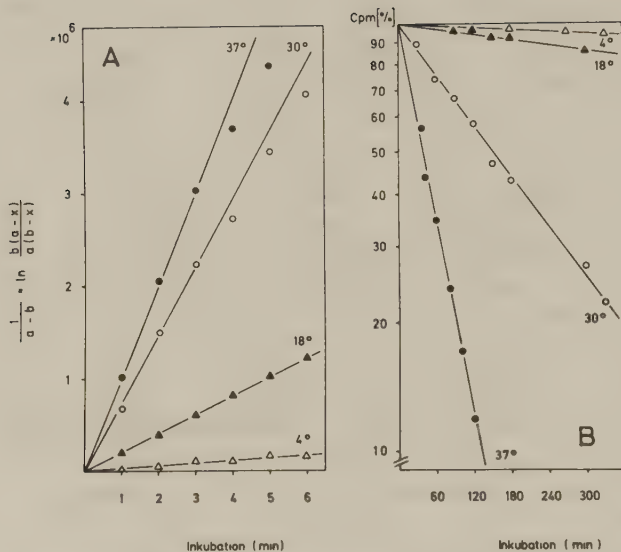


Abb. 36

Assoziation und Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes aus Ratten-Hirn-Membranen

A: Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} (siehe Abb. 35)

B: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1}

Hirnzellmembranen (13.5 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.71 U/mg Protein) wurden bei 37°C 120 min lang in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 110 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe durch Abzentrifugieren vom überschüssigen ^3H -g-Strophanthin abgetrennt (siehe 2.2.4.1.).

Das Sediment wurde in 5.0 ml 0.1 M Imidazol/HCl pH 7.25 homogenisiert. Aliquote Anteile dieser ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (Protein 0.4 mg) wurden bei den angegebenen Temperaturen in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Die nach den angegebenen Zeiten jeweils noch vorhandene membrangebundene Radioaktivität wurde gemessen (siehe 2.2.4.2.). Aus der Neigung der linearen Zerfallskurven wurde die jeweilige Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} errechnet. Ermittlung der unspezifischen Bindung nach 2.2.3.5. und 2.2.4.2.1.

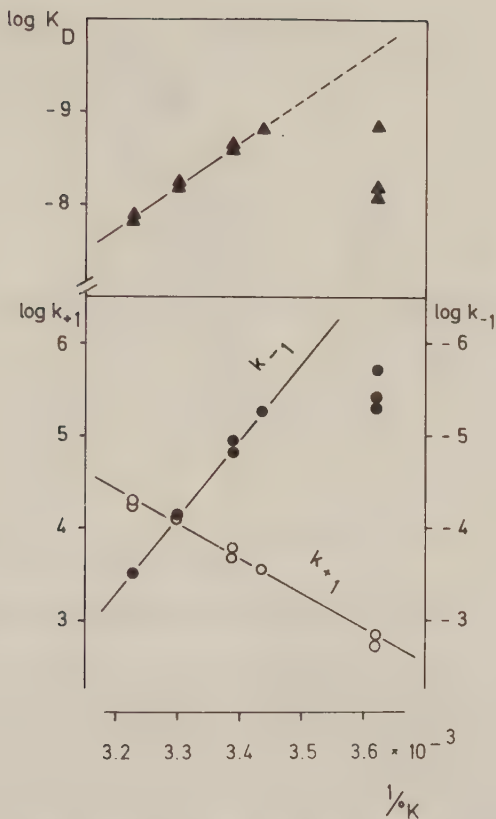


Abb. 37

Arrhenius-Auftragung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Temperatur
- Rattenhirnmembranen -

A: Die jeweiligen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten $\circ \text{---} \circ$ der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung wurden aus der Steigung der entsprechenden linearen Assoziationskurve der Abb. 35 errechnet.

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten $\bullet \text{---} \bullet$ der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung wurden aus der linearen Zerfallskurve der Abb. 36 B bestimmt.

B: Auftragung der reziproken Gleichgewichtskonstanten ($1/K_D$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

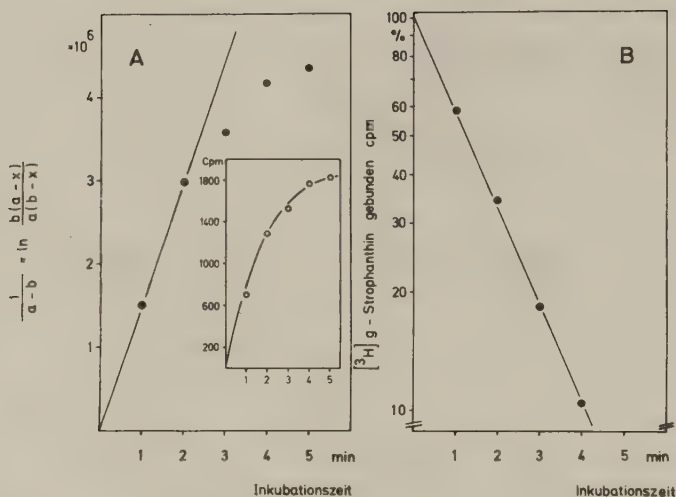


Abb. 38

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Nieren-Membranen

A: Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1}

Nierenzellmembranen (0.047 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 1.1 U/mg Protein; Rezeptor-Konzentration 8.2 nM) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4.1 nM ^3H -g-Strophanthin minutenlang inkubiert (siehe 2.2.3.1.). Gesamtvolumen 2.0 ml. Die Bindungsdaten wurden in der Reaktionsgleichung für Reaktionen 2. Ordnung eingesetzt und aus der Steigung die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} errechnet.

B: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1}

Nierenzellmembranen (2.3 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 1.1 U/mg Protein) wurde 20 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 80 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe durch Abzentrifugieren vom überschüssigen ^3H -g-Strophanthin abgetrennt (siehe 2.2.4.1.).

Das Sediment wurde in 5.0 ml 0.1 M Imidazol/HCl pH 6.5 homogenisiert. Aliquote Anteile dieser ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (Protein 0.2 mg) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Die nach den angegebenen Zeiten jeweils noch vorhandene membran-gebundene Radioaktivität wurde gemessen.

Aus der Neigung der Geraden wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} errechnet. Die unspezifische Bindung wurde gemessen nach 2.2.3.5. und 2.2.4.2.1.

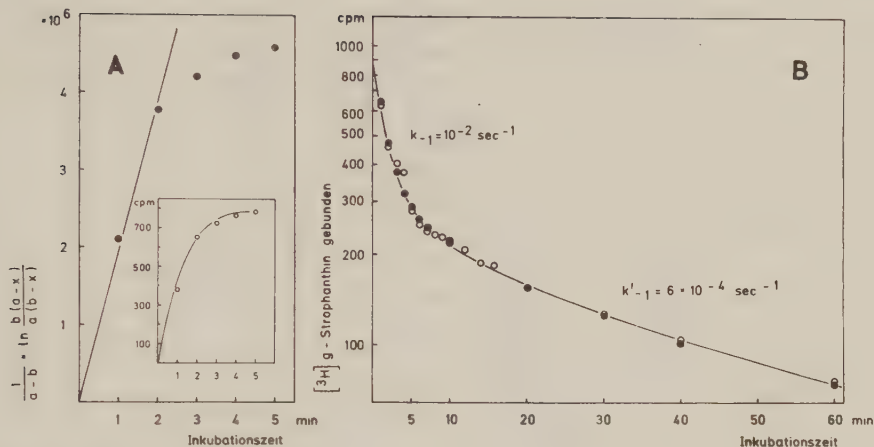


Abb. 39

Assoziation und Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Ratten-Herz-Membranen

A: Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1}

Herzmuskelzellmembranen (0.72 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.14 U/mg Protein; Rezeptor-Konzentration 0.5 nM) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde zu den angegebenen Zeiten mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die membrangebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.), zeitabhängig aufgetragen (in cpm) und in eine Reaktionsgleichung für Reaktionen 2. Ordnung eingesetzt. Aus dem initial linearen Kurvenverlauf kann aus der Steigung der Geraden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} errechnet werden.

B: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1}

Herzmuskelzellmembranen (43 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.14 U/mg Protein) wurden bei 37°C 7 min lang in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 40 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe durch Abzentrifugieren vom überschüssigen ^3H -g-Strophanthin abgetrennt (siehe 2.2.4.1.).

Das Sediment wurde in 5.0 ml 0.1 M Imidazol/HCl pH 6.5 homogenisiert. Aliquote Anteile dieser ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (Protein 1 mg) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und (●●●) 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins oder (○●○) in gleicher Inkubationslösung ohne Strophanthin zu einer Verdünnung 1:100 inkubiert (siehe 2.2.4.2.). Zu den angegebenen Zeiten wurde die dann noch membrangebundene Radioaktivität rasch abfiltriert und gemessen. Durch graphische Approximation (Weidemann et al., 1970) können zwei verschiedene Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten errechnet werden. Ermittlung der unspezifischen Bindung nach 2.2.3.5. und 2.2.4.2.1.

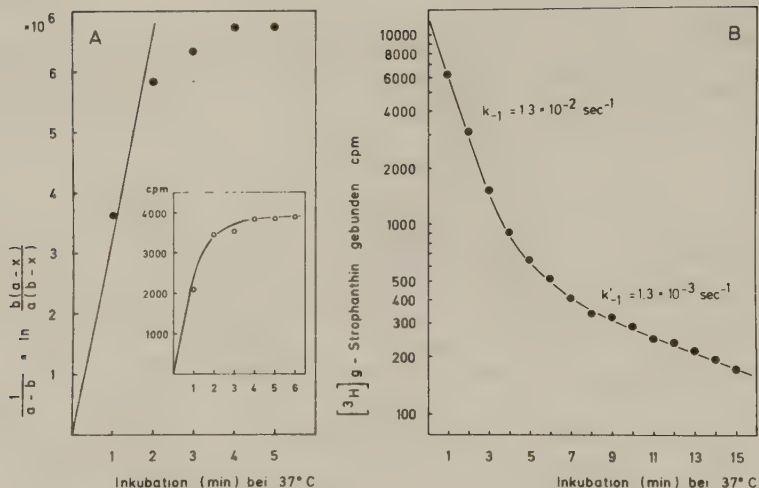


Abb. 40

Assoziation und Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Meerschweinchen-Herz-Membranen

A: Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1}

Herzmuskelzellmembranen (0.39 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.26 U/mg Protein; Rezeptor-Konzentration 10.3 nM) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 4 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde zu den angegebenen Zeiten mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert. Die membrangebundene Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen (siehe 2.2.3.1.), zeitabhängig aufgetragen (in cpm) und in eine Reaktionsgleichung für Reaktionen 2. Ordnung eingesetzt. Aus dem initial linearen Kurvenverlauf kann aus der Steigung der Geraden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} errechnet werden.

B: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1}

Herzmuskelzellmembranen (15.6 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.26 U/mg Protein) wurden 10 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 80 nM ^3H -g-Strophanthin inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe durch Abzentrifugieren vom überschüssigen ^3H -g-Strophanthin abgetrennt (siehe 2.2.4.1.).

Das Sediment wurde in 4.0 ml 0.1 M Imidazol/HCl pH 6.5 homogenisiert. Aliquote Anteile dieser ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe (Protein 0.7 mg) wurden bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins inkubiert (siehe 2.2.4.2.). Zu den angegebenen Zeiten wurde die dann noch membrangebundene Radioaktivität rasch abfiltriert und gemessen. Durch graphische Approximation können zwei verschiedene Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten errechnet werden.

Ermittlung der unspezifischen Bindung nach 2.2.3.5. und 2.2.4.2.1.

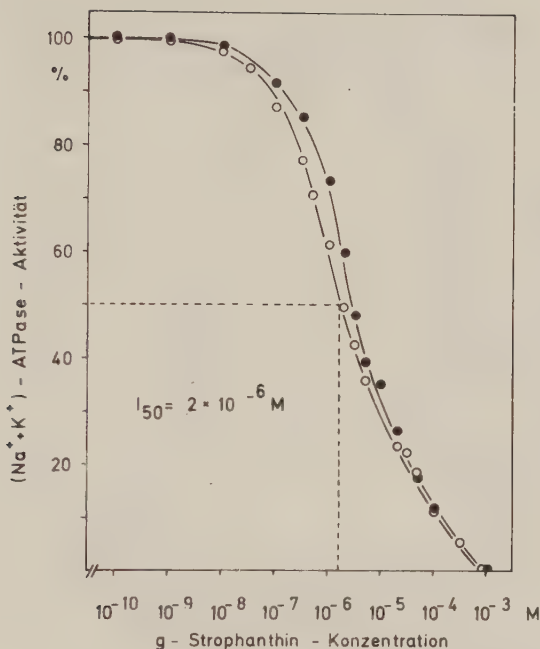


Abb. 41

Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ -Aktivität durch $g\text{-Strophanthin}$ an Ratten-Hirn-Membranen

- Hirnzellmembranen (0.3 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ -Aktivität 0.25 U/mg Protein) wurden bei 37°C in den optisch-gekoppelten Test eingebracht. Nach etwa 5 min wurde $g\text{-Strophanthin}$ hinzugefügt. Die der jeweiligen $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentration entsprechende maximale Hemmung wurde nach wenigen Minuten erreicht; dieser äquilibrierte Wert wurde der Auswertung zugrundegelegt (siehe 2.2.2.2.).
- Hirnzellmembranen (2.6 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ -Aktivität 0.2 U/mg Protein) wurden 8 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und den angegebenen $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentrationen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0.5 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der identische $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentrationen enthielt. Der Extinktionsverlauf und damit die ATPase-Aktivität wurde kontinuierlich registriert und die etwa nach 1 min gemessene $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ -Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.3.).

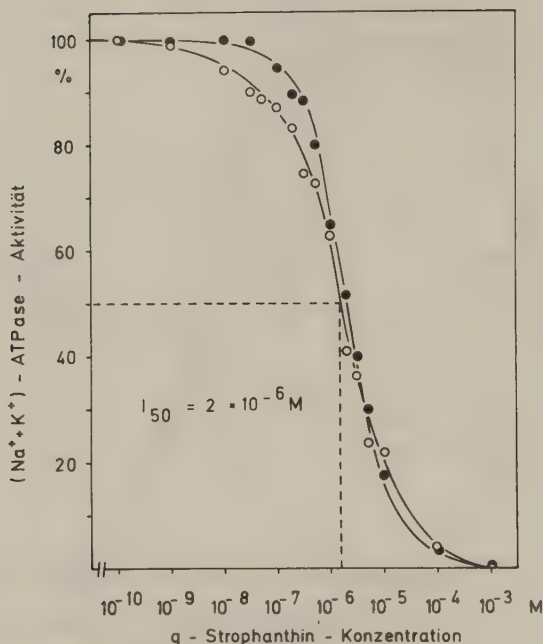


Abb. 42

Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität durch g-Strophanthin an Meerschweinchen-Hirn-Membranen

- Hirnzellmembranen (0.07 mg Protein; ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität 0.57 U/mg Protein) wurden bei 37°C in den optisch-gekoppelten Test eingebracht. Nach etwa 5 min wurde g-Strophanthin hinzugefügt. Die der jeweiligen g-Strophanthin-Konzentration entsprechende maximale Hemmung wurde nach wenigen Minuten erreicht; dieser äquilibrierte Wert wurde der Auswertung zugrundegelegt (siehe 2.2.2.2.).
- Hirnzellmembranen (1.05 mg Protein; ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität 0.57 U/mg Protein) wurden 120 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und den angegebenen g-Strophanthin-Konzentrationen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0.5 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der identische g-Strophanthin-Konzentrationen enthielt. Der Extinktionsverlauf und damit die ATPase-Aktivität wurde kontinuierlich registriert und die etwa nach 1 min gemessene ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.3.).

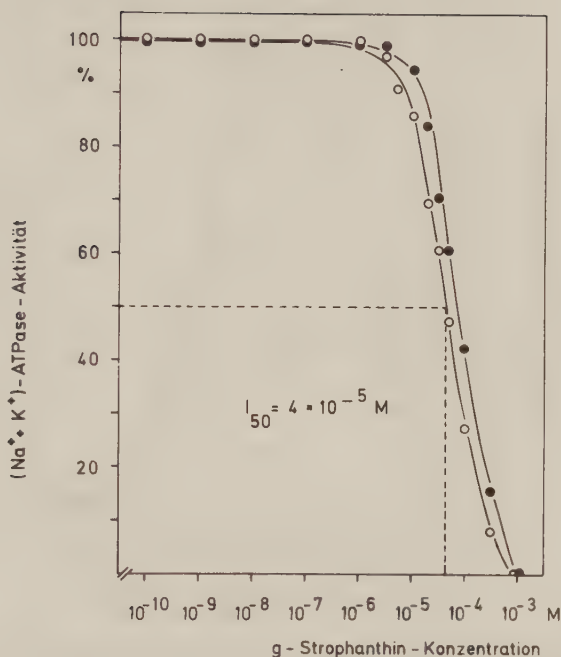


Abb. 43

Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität durch g-Strophanthin an Ratten-Nieren-Membranen

- Nierenzellmembranen (0.01 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 3.7 U/mg Protein) wurden bei 37°C in den optisch-gekoppelten Test eingebracht. Nach etwa 5 min wurde g-Strophanthin hinzugefügt. Die der jeweiligen g-Strophanthin-Konzentration entsprechende maximale Hemmung wurde nach wenigen Minuten erreicht; dieser äquilibrierte Wert wurde der Auswertung zugrundegelegt (siehe 2.2.2.2.).
- Nierenzellmembranen (0.2 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 3.7 U/mg Protein) wurden 30 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und den angegebenen g-Strophanthin-Konzentrationen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0.5 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der identische g-Strophanthin-Konzentrationen enthielt. Der Extinktionsverlauf und damit die ATPase-Aktivität wurde kontinuierlich registriert und die etwa nach 1 min gemessene $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.3.).

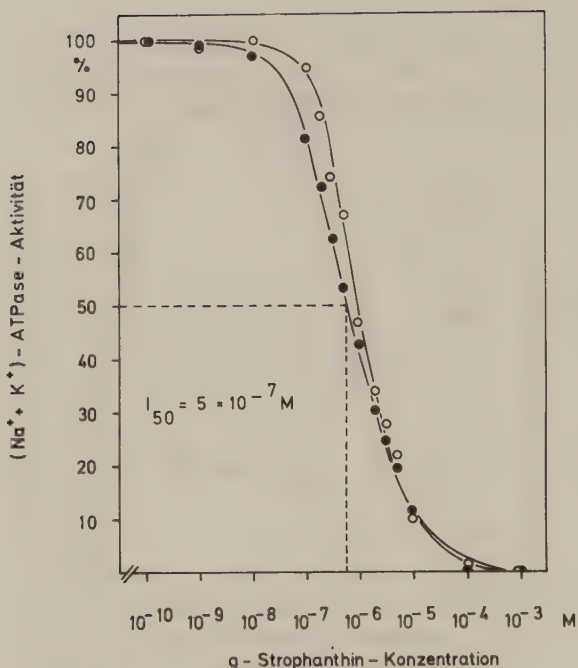


Abb. 44

Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität durch $g\text{-Strophanthin}$ an Meerschweinchen-Nieren-Membranen

- o—o Nierenzellmembranen (0.047 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 1.15 U/mg Protein) wurden bei 37°C in den optisch-gekoppelten Test eingebracht. Nach etwa 5 min wurde $g\text{-Strophanthin}$ hinzugefügt. Die der jeweiligen $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentration entsprechende maximale Hemmung wurde nach wenigen Minuten erreicht; dieser äquilibrierte Wert wurde der Auswertung zugrundegelegt (siehe 2.2.2.2.).
- Nierenzellmembranen (0.47 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 1.15 U/mg Protein) wurden 25 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und den angegebenen $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentrationen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0.5 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der identische $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentrationen enthielt.
Der Extinktionsverlauf und damit die ATPase-Aktivität wurde kontinuierlich registriert und die etwa nach 1 min gemessene $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.3.).

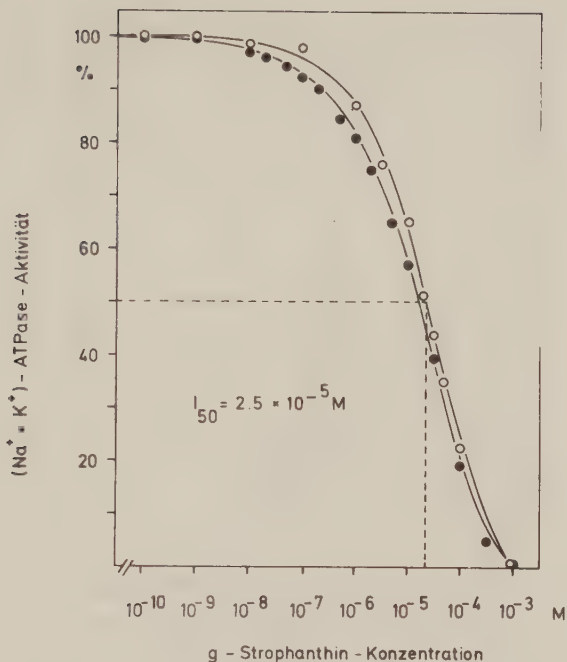


Abb. 45

Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität durch $g\text{-Strophanthin}$ an Ratten-Skelettmuskel-Membranen

- Skelettmuskelmembranen (0.05 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden bei 37°C in den optisch-gekoppelten Test eingebracht. Nach etwa 5 min wurde $g\text{-Strophanthin}$ hinzugefügt. Die der jeweiligen $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentration entsprechende maximale Hemmung wurde nach wenigen Minuten erreicht; dieser äquilibrierte Wert wurde der Auswertung zugrundegelegt (siehe 2.2.2.2.).
- Skelettmuskelmembranen (3.9 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden 4 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und den angegebenen $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentrationen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0.5 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der identische $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentrationen enthielt. Der Extinktionsverlauf und damit die ATPase-Aktivität wurde kontinuierlich registriert und die etwa nach 1 min gemessene $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.3.).

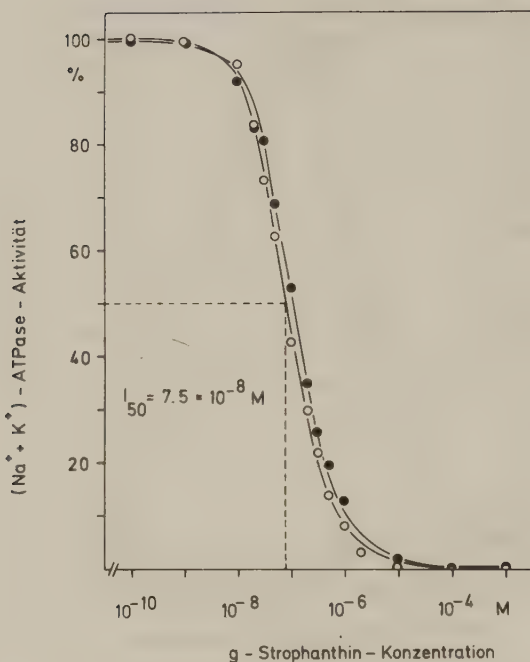


Abb. 46

Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität durch g-Strophanthin an Meerschweinchen-Skelettmuskel-Membranen

- Skelettmuskelmembranen (0.1 mg Protein; ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität 0.25 U/mg Protein) wurden bei 37°C in den optisch-gekoppelten Test eingebracht. Nach etwa 5 min wurde g-Strophanthin hinzugefügt. Die der jeweiligen g-Strophanthin-Konzentration entsprechende maximale Hemmung wurde nach wenigen Minuten erreicht; dieser äquilibrierte Wert wurde der Auswertung zugrundegelegt (siehe 2.2.2.2.).
- Skelettmuskelmembranen (1.0 mg Protein; ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität 0.2 U/mg Protein) wurden 13 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und den angegebenen g-Strophanthin-Konzentrationen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0.5 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der identische g-Strophanthin-Konzentrationen enthielt. Der Extinktionsverlauf und damit die ATPase-Aktivität wurde kontinuierlich registriert und die etwa nach 1 min gemessene ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.3.).

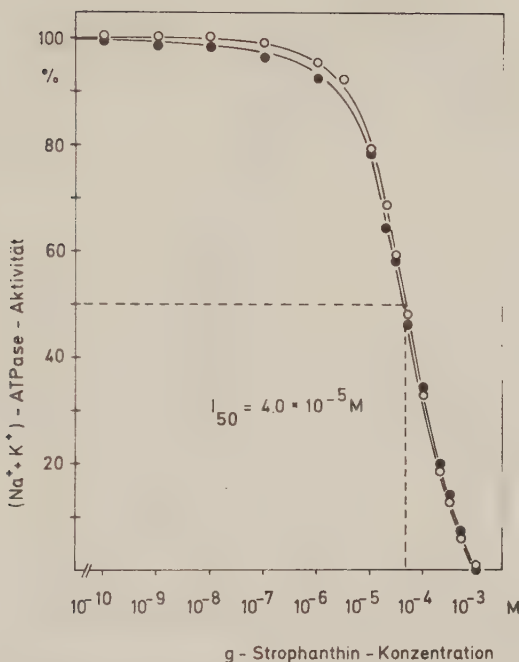


Abb. 47

Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität durch g-Strophanthin an Ratten-Herz-Membranen

- Herzmuskelzellmembranen (0.3 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.25 U/mg Protein) wurden bei 37°C in den optisch-gekoppelten Test eingebracht. Nach etwa 5 min wurde g-Strophanthin hinzugefügt. Die der jeweiligen g-Strophanthin-Konzentration entsprechende maximale Hemmung wurde nach wenigen Minuten erreicht; dieser äquilibrierte Wert wurde der Auswertung zugrundegelegt (siehe 2.2.2.2.).
- Herzmuskelzellmembranen (2.6 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.21 U/mg Protein) wurden 8 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und den angegebenen g-Strophanthin-Konzentrationen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0.5 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der zusätzlich identische g-Strophanthin-Konzentrationen enthielt. Der Extinktionsverlauf und damit die ATPase-Aktivität wurde kontinuierlich registriert und die etwa nach 1 min gemessene $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.3.).

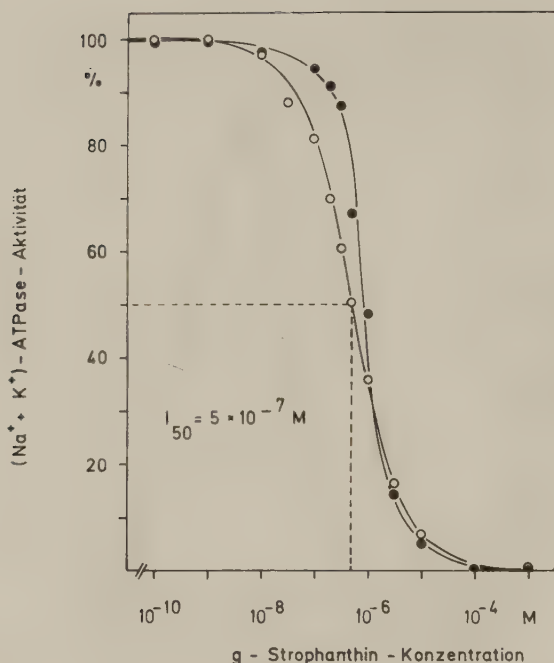


Abb. 48

Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität durch $g\text{-Strophanthin}$ an Meerschweinchen-Herz-Membranen

- Herzmuskelzellmembranen (0.2 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.26 U/mg Protein) wurden bei 37°C in den optisch-gekoppelten Test eingebracht. Nach etwa 5 min wurde $g\text{-Strophanthin}$ hinzugefügt. Die der jeweiligen $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentration entsprechende maximale Hemmung wurde nach wenigen Minuten erreicht; dieser äquilibrierte Wert wurde der Auswertung zugrundegelegt (siehe 2.2.2.2.).
- Herzmuskelzellmembranen (0.8 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.26 U/mg Protein) wurden 8 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und den angegebenen $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentrationen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0.5 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der identische $g\text{-Strophanthin}$ -Konzentrationen enthielt. Der Extinktionsverlauf und damit die ATPase -Aktivität wurde kontinuierlich registriert und die etwa nach 1 min gemessene $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität bestimmt (siehe 2.2.2.3.).

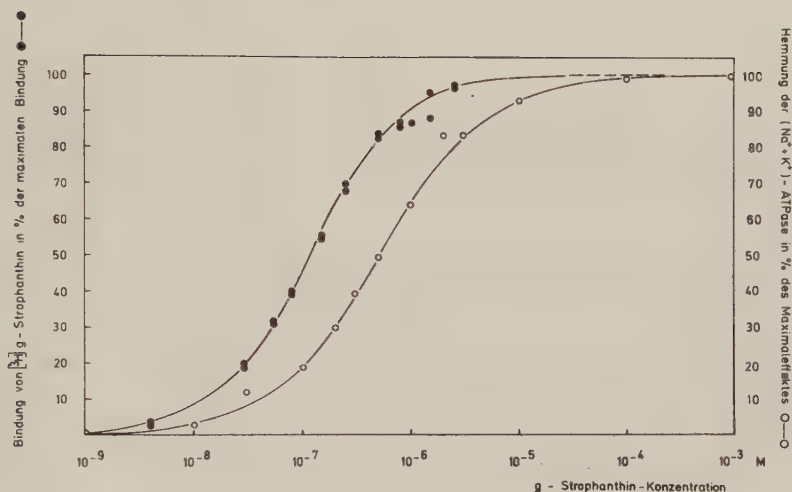


Abb. 49

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Meerschweinchen-Herz-Membranen und Hemmung der $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-ATPase}$ durch g-Strophanthin

○ — ○ Herzmuskelzellmembranen (0.8 mg Protein; $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.26 U/mg Protein) wurden 8 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 und den angegebenen g-Strophanthin-Konzentrationen inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 1.0 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test bei 37°C eingebracht, der zusätzlich identische g-Strophanthin-Konzentrationen enthielt. Der Extinktionsverlauf wurde kontinuierlich 10 min lang registriert und die etwa nach 1 min aufgezeichnete $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität der Auswertung zugrundegelegt (siehe 2.2.2.3.).

● — ● Herzmuskelzellmembranen (0.4 mg Protein; $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.26 U/mg Protein) wurden 8 min lang in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen (2.5×10^{-8} M bis 2.5×10^{-6} M) nicht markierten g-Strophanthins inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch rasches Abfiltrieren über Glasfaserfiltern beendet (siehe 2.2.3.2.). Die Radioaktivität auf den Filtern wurde gemessen und die Bindungsdaten nach Scatchard ausgewertet. Die gezeigten Kurvenpunkte geben die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an in % der maximalen Bindung in Abhängigkeit von der g-Strophanthin-Konzentration.

Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an die Zellmembranen wurde in Gegenwart von 10^{-3} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

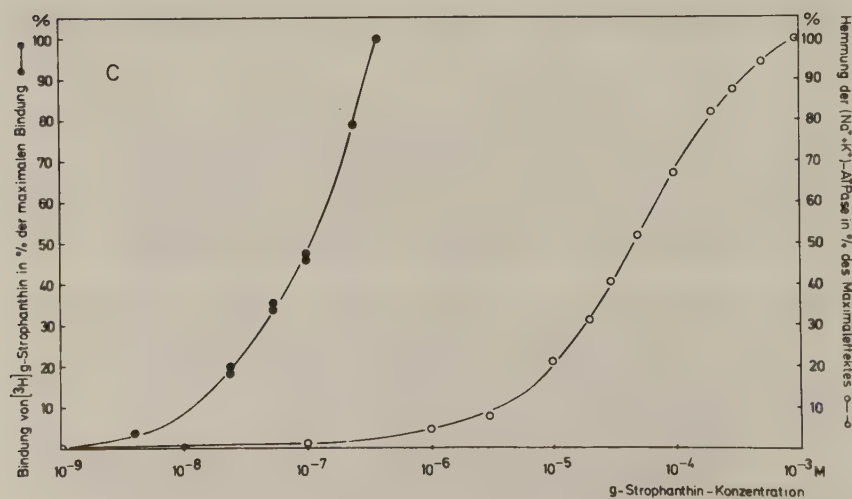
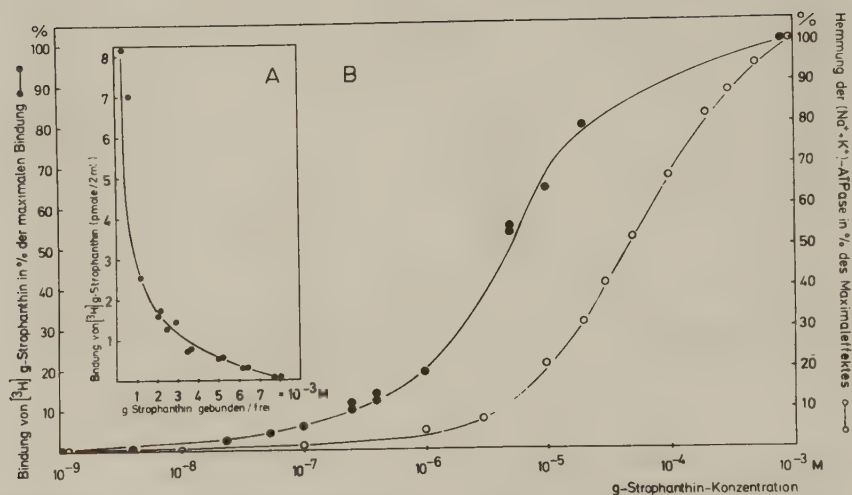


Abb. 50

Abb. 50

Hochaffine Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Herz-Membranen und Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität durch g-Strophanthin

o—o Herzmuskelzellmembranen (2.5 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.20 U/mg Protein) wurden 8 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 und den angegebenen g-Strophanthin-Konzentrationen inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.
Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 0.5 ml dieses Inkubates in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der zusätzlich identische g-Strophanthin-Konzentrationen enthielt. Der Verlauf der ATPase-Aktivität wurde kontinuierlich 10 min lang registriert. Der Auswertung zugrundegelegt wurde die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität nach etwa 1 min (siehe 2.2.2.3.).

●—● Herzmuskelzellmembranen (1.25 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.1 U/mg Protein) wurden 5 min lang bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins (2×10^{-8} M bis 2×10^{-5} M) inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.
Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin rasch abfiltriert und die membrangebundene Radioaktivität auf den Glasfaserfiltern gemessen (siehe 2.2.3.2.). Die unspezifische ^3H -g-Strophanthin-Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-5} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (siehe 2.2.3.5.).

A: In der Scatchard-Auftragung der Bindungsdaten ergibt sich ein gekrümmter Kurvenverlauf, aus dem durch graphische Approximation die Dissoziationskonstanten für mindestens 2 verschiedene Rezeptoren errechnet werden können.

B: Aus dem Schnittpunkt der Ordinate und der Tangente an den Kurvenanteil (Abb. A), der dem niederaffinen Rezeptor entspricht, kann die Anzahl der im Inkubationsmedium maximal vorhandenen Bindungsstellen abgelesen werden (100%). Die Kurvenpunkte in B geben die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an in % der maximalen Bindung in Abhängigkeit von der g-Strophanthin-Konzentration.

C: Hier sind nur die Bindungsdaten des hochaffinen Rezeptors aufgetragen ($K_D \sim 10^{-7}$ M). Der Schnittpunkt der Ordinate mit der Tangente an den Kurvenanteil (Abb. A), der dem hochaffinen Rezeptor entspricht, beziffert die Anzahl der vorhandenen hochaffinen Bindungsstellen (100%). Die Kurvenpunkte geben dann hier die prozentuale Bindung von ^3H -g-Strophanthin ausschließlich an den hochaffinen Rezeptor an in % der maximalen Bindung in Abhängigkeit von der g-Strophanthin-Konzentration.

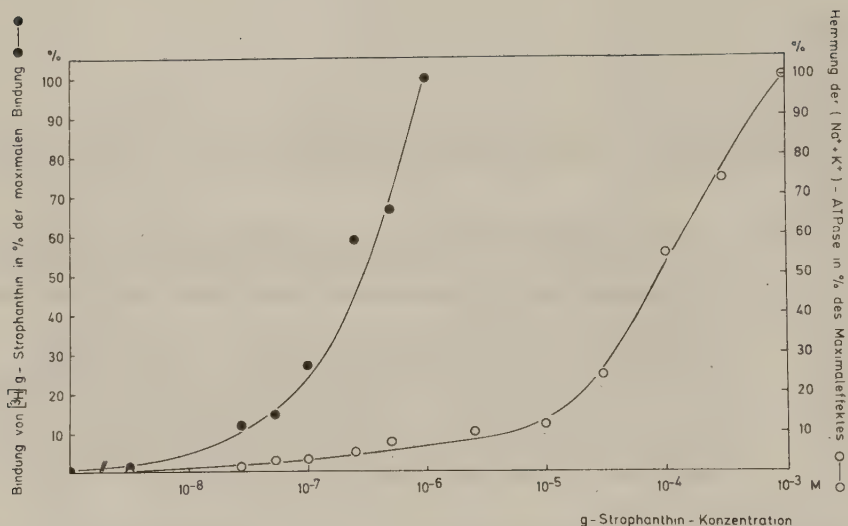


Abb. 51

Hochaffine Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Ratten-Herz-Membranen und gleichzeitige Hemmung der $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität durch g-Strophanthin

Herzmuskelzellmembranen (2.7 mg Protein; $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.16 U/mg Protein) wurden bei 37°C 8 min lang inkubiert in 50 mM Imidazol/HCl pH 6.5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 3.2×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins (2.5×10^{-8} M bis 1.0×10^{-3} M). Gesamtvolumen 4.0 ml.

- — ● Nach der angegebenen Reaktionszeit wurden aus dem Inkubat dreimal jeweils 1.0 ml zur Messung der ^3H -g-Strophanthin-Bindung an die Membranen entnommen und mit Hilfe von Glasfaserfiltern rasch abfiltriert (siehe 2.2.3.2.).

Die Bindungsdaten wurden nach Scatchard ausgerechnet. Aufgetragen wurden nur jene Werte, die dem hochaffinen Rezeptor entsprechen (siehe Abb. 50).

- — ○ 0.7 ml des Inkubates wurden zur Bestimmung der $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität in den optisch-gekoppelten Test eingebracht, der zusätzlich identische g-Strophanthin-Konzentrationen enthielt. Der Extinktionsverlauf wurde kontinuierlich registriert und die $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität nach 1 min ausgemessen (siehe 2.2.2.3.).

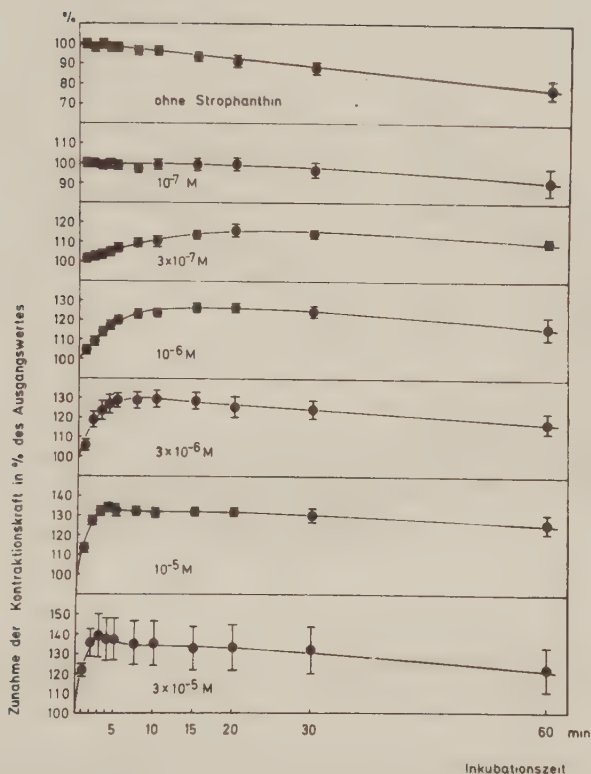


Abb. 52

Zeitabhängiger Verlauf des Effektes von *g*-Strophanthin auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter Ventrikelstreifen aus Rattenherzen

Die Ventrikelstreifen wurden in einem Inkubationsbad in Tyrodelösung mit 5.4 mM K⁺ und den angegebenen *g*-Strophanthin-Konzentrationen mit einer Frequenz von 1 Hz gereizt (siehe 2.3.1.).

Der Verlauf der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich registriert. Jeder Meßpunkt auf den Kurven ist der Durchschnittswert von 4 bis 8 Experimenten ($\pm$ SEM). Muskeln, die arrhythmisch schlugen oder Kontraktur zeigten, wurden verworfen. Alle *g*-Strophanthin-Konzentrationen über 3×10^{-5} M führten zu Arrhythmie und/oder Kontraktur.

Diese Messungen der Kontraktionskraft schlagender Ventrikelstreifen aus Ratten-Herzen wurden im Pharmakologischen Institut der Medizinischen Hochschule Hannover, Abteilung III (Biochemische Pharmakologie) in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. med. Hasso Scholz durchgeführt, dem ich herzlich für die erwiesene Hilfe danke.

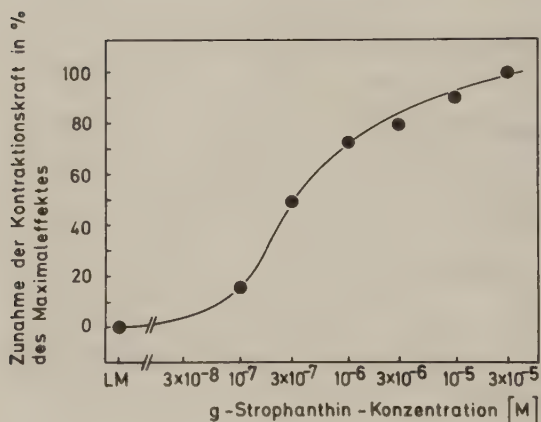


Abb. 53

Konzentrations-Wirkungskurve für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin auf Ventrikelstreifen aus Ratten-Herzen

Der maximal positiv inotrope Effekt bei den einzelnen g-Strophanthin-Konzentrationen aus Abb. 52 wurde gegen die steigende g-Strophanthin-Konzentration aufgetragen.

Die Zunahme der Kontraktionskraft nach 3 min bei einer g-Strophanthin-Konzentration von 3×10^{-5} M wurde als Maximal-effekt (100%) gewertet, da höhere g-Strophanthin-Konzentrationen regelmäßige Arrhythmie oder Kontraktur zeigten.

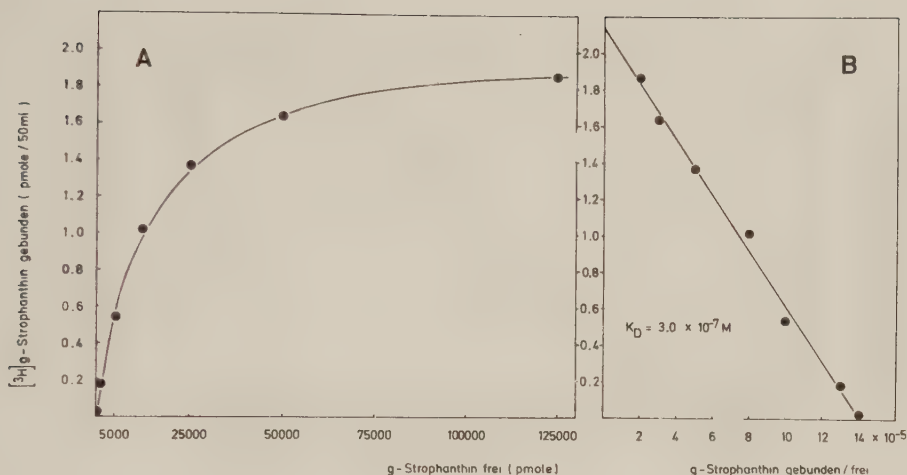


Abb. 54

Bindung von ³H-g-Strophanthin an schlagende Ventrikelstreifen aus Ratten-Herzen

Ventrikelstreifen von 15 bis 20 mg Gewicht, einer Länge von etwa 10 mm und einer Dicke von maximal 1 mm wurden bei 37°C in Tyrode-Lösung 5.4 mM K⁺ enthaltend mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch gereizt. Der Verlauf der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich registriert. Nach einer Äquilibrierungsphase von etwa 60 min wurden $4 \times 10^{-9} M$ ³H-g-Strophanthin und steigende Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins ($2.5 \times 10^{-8} M$ bis $2.5 \times 10^{-6} M$) zugegeben (siehe 2.3.2.).

Als jeweils erforderliche Inkubationszeit wurde den Verlaufskurven der Abb. 52 der Zeitpunkt des jeweiligen maximalen Effektes für die einzelnen g-Strophanthin-Konzentrationen entnommen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von $10^{-4} M$ g-Strophanthin bestimmt.

Die Bindungsdaten in Abb. A sind in Abb. B nach Scatchard aufgetragen. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert von 3 Versuchen.

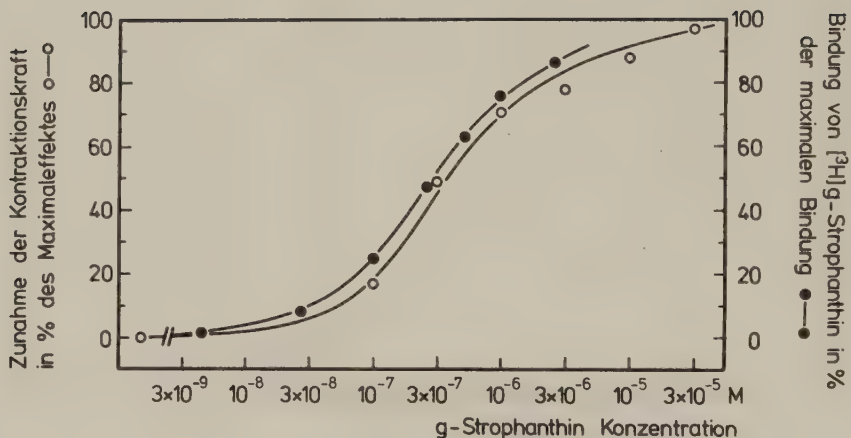


Abb. 55

Konzentrations-Wirkungskurve

- für die Bindung von ³H-g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor in schlagenden Ventrikelstreifen aus Rattenherzen. Bindungsdaten der Abb. 54, wobei die Kurvenpunkte hier die prozentuale Bindung von ³H-g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor angeben in % der maximalen Bindung und in Abhängigkeit von der g-Strophanthin-Konzentration.
- für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft schlagender Ventrikelstreifen (Daten der Abb. 53).

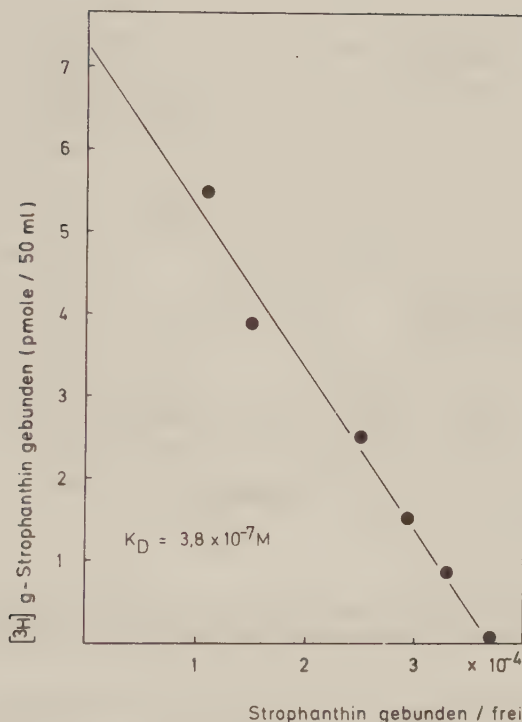


Abb. 56

Bindung von ^3H -g-Strophanthin an schlagende Skelettmuskelstreifen (M. soleus) der Ratte

Skelettmuskelstreifen von 30 ~ 40 mg Gewicht, einer Länge von etwa 20 mm und einer Dicke von maximal 1 mm wurden in Tyrodelösung (5,4 mval K^+) mit einer Reizfrequenz von 0.25 Hz elektrisch gereizt. Der Verlauf der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich registriert. Nach einer Äquilibrationsphase von etwa 60 min wurden 4×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin und steigende Konzentrationen nicht markierten g-Strophanthins zugegeben (2×10^{-8} M bis 1×10^{-6} M). Inkubationszeit 30 min bei 37°C .

Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-4} M nicht markierten g-Strophanthins bestimmt (Präparation und Inkubation wie nach 2.3.2.).

Die Bindungsdaten wurden nach Scatchard aufgetragen. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert aus drei Versuchen.

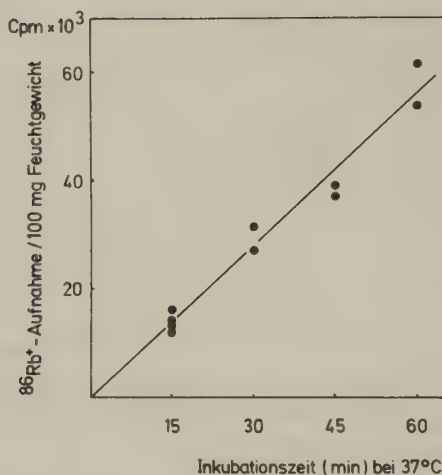


Abb. 57

$^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in schlagende Ventrikelstreifen aus Rattenherzen

Ventrikelstreifen von 10 - 20 mg Gewicht, einer Länge von etwa 10 mm und einer Dicke von maximal 1 mm wurden bei 37°C in Tyrode-Lösung (5.4 mM K^+) mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch gereizt. Der Verlauf der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich registriert.

Nach der Äquilibrationsphase von etwa 60 min wurde 0.1 ml einer $^{86}\text{Rb}^+$ -Lösung zugegeben (etwa $1.5 \mu\text{Ci}$ mit etwa $3 \times 10^6 \text{ cpm}$ in jeweils 50 ml Inkubationsmedium). Nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit wurde in den Ventrikelstreifen die aufgenommene Radioaktivität bestimmt (siehe 2.3.3.).

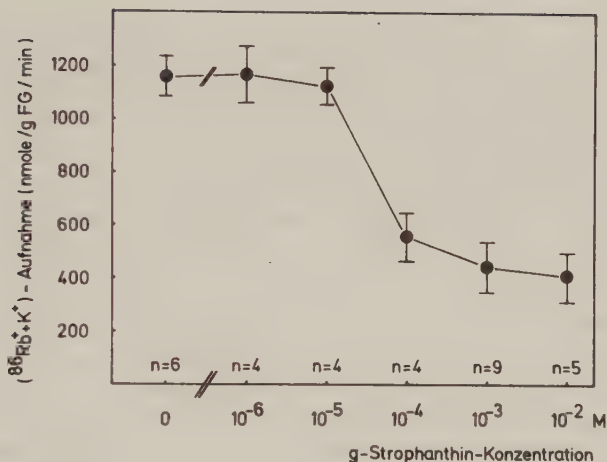


Abb. 58

Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in schlagende Ventrikelsstreifen der Ratte durch g-Strophanthin

Ventrikelsstreifen von 10 - 20 mg Gewicht, einer Länge von etwa 10 mm und einer Dicke von maximal 1 mm wurden bei 37°C in Tyrode-Lösung (5.4 mM K^+) mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch gereizt. Der Verlauf der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich registriert.

Nach der Äquilibrationsphase von etwa 60 min wurde g-Strophanthin in steigenden Konzentrationen zugegeben. Als jeweils erforderliche Inkubationszeit wurde der Verlaufskurve der Abb. 52 der Zeitpunkt des jeweiligen Maximaleffektes für die einzelnen g-Strophanthin-Konzentrationen entnommen. Danach wurde zum g-Strophanthin-enthaltenden Inkubationsmedium 0.1 ml einer $^{86}\text{Rb}^+$ -Lösung (etwa 1.5 μCi) hinzugegeben und die dann nach weiteren 10 min aufgenommene Radioaktivität gemessen (siehe 2.3.4.).

4. DISKUSSION

Im Bemühen, den Wirkungsmechanismus der Herzglykoside aufzuklären, ergaben bisherige Untersuchungen, daß die Herzglykoside an einen spezifischen Herzglykosid-Rezeptor gebunden werden. Das entsprechende Bindungsprotein ist ein in der Zellwand lokalisiertes Makromolekül und mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase identisch oder zumindest eng verknüpft (Whittam und Chipperfield, 1973; Erdmann und Schoner, 1973; Dahl und Hokin, 1974; Schwartz et al., 1975; Jørgensen, 1975; Glynn und Karlish, 1975; Erdmann, 1978; Wallick et al., 1979). Dabei konnte bewiesen werden, daß die Bindung von Herzglykosiden an den Herzglykosid-Rezeptor mit hoher Affinität erfolgt, reversibel ist, einer Sättigungskinetik gehorcht und zu einer reproduzierbaren Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase führt und daß dann über noch unbekannte Folgereaktionen in der Myokardzelle eine Steigerung der Kontraktionskraft eintritt. Die dazu erforderlichen Konzentrationen sind sehr gering und liegen für den Menschen und viele andere untersuchten Spezies im Nanomolarbereich als Ausdruck der hohen Rezeptoraffinität und Spezifität. Ratte und Meerschweinchen hingegen gelten als relativ digitalisresistent, da bei diesen Spezies um den Faktor 100 bis 1000 höhere Glykosidkonzentrationen eingesetzt werden müssen, um am Herzmuskel einen positiv inotropen Effekt zu erzielen. Die Ursache für diese relative Unempfindlichkeit gegenüber Herzglykosiden ist noch weitgehend unbekannt. Nach vergeblichen Versuchen, an der Ratte eine reproduzierbare und quantifizierbare Rezeptorbindung von g-Strophanthin zu messen (Allen und Schwartz, 1969; Akera et al., 1972; Inturrisi und Papaconstantinou, 1974), wurde eine solche quantifizierbare Rezeptorkinetik erstmals von Sharma und Banerjee (1978) nachgewiesen und damit auch erstmals ein spezifischer Herzglykosid-Rezeptor am Ratten-Herz.

Die von uns durchgeführten Experimente hatten das Ziel, solche spezifischen Herzglykosid-Rezeptoren an verschiedenen Organen von Ratte und Meerschweinchen nachzuweisen und zu quantifizieren, ihre Eigenschaften zu untersuchen, ihre Korrelation mit dem $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-System zu überprüfen und die Rezeptorbindung

mit der Zunahme der Kontraktionskraft in Verbindung zu bringen. Anhand der Vielzahl der Einzelmessungen sollen nun einige wichtige Fragestellungen eingehender besprochen werden:

- 1) Sind die Ergebnisse aus Bindungsstudien an isolierten Zellmembranen direkt übertragbar auf intaktes Gewebe und handelt es sich bei der Herzglykosidbindungsstelle um einen echten Herzglykosid-Rezeptor?
- 2) Ist die Rezeptorbindung mit der Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase verknüpft?
- 3) Was erklärt die relative Insensitivität von Ratte und Meerschweinchen gegenüber g-Strophanthin?

4.1. Herzglykosid-Rezeptoren in isolierten Zellmembranen und in intaktem Gewebe

Die Wirkstärke eines Pharmakons ist der Zahl der von ihm besetzten Rezeptoren proportional (Clark, 1935). Das gilt auch für die Wirkung von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft einer schlagenden Muskelzelle. Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz bestimmen die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} die Menge des gebildeten g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes und damit das Ausmaß des Effektes dieses Pharmakons. Als Ausdruck einer hohen Selektivität und Affinität des Pharmakons zu seinem Rezeptor gilt eine niedrige Dissoziationskonstante des jeweiligen Pharmakon-Rezeptor-Komplexes. Effekte einer Pharmakon-Rezeptor-Interaktion wie hier die Zunahme der Kontraktionskraft werden an intakten lebenden Zellen gemessen. Kinetische Konstanten allerdings können in der Regel nur an isolierten Zellmembranen ermittelt werden. Der Nachweis von spezifischen Rezeptoren bedeutet aber mehr als nur den Nachweis von Bindungsproteinen und verlangt weitere "Beweise" wie z.B. eine direkte Korrelation des selektiven Pharmakoneffektes mit den kinetischen Konstanten des jeweiligen Pharmakon-Rezeptor-Komplexes.

Bei Versuchen mit isolierten Zellmembranen muß immer berücksichtigt werden, daß nicht abzusehen ist, welche Veränderungen durch die Membranpräparation an der Zellmembran selbst auftreten. Die Zellen werden aus dem physiologischen Zellverband herausgerissen, die Membranproteine können in ihrer Tertiär- und Quartärstruktur verändert werden, können durch Bruch von Wasserstoff- und SH-Brücken-Bindungen oder Ladungsverschiebungen destabilisiert werden, sie werden einem anderen Ionenmilieu ausgesetzt, bei unphysiologischen pH-Werten und mit unphysiologischen Substanzen behandelt und inkubiert, u.s.w.

Versuchsergebnisse an isolierten Zellmembranen sind daher immer kritisch zu interpretieren. So haben Werdan et al. (1980) sogar nachgewiesen, daß durch Vanadat die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase aus isolierten Zellmembranen gehemmt, in intakten Zellen aber offensichtlich stimuliert wird. Mit solchen Problemen von Zellmembranpräparationen sind auch wir konfrontiert worden. So folgt die spezifische, zeitabhängige Bindung von 3H -g-Strophanthin nicht immer der erwarteten Sättigungskinetik. Bei Meerschweinchen-Skelettmuskel-, Ratten-Herz und Ratten-Skelettmuskel-Membranen (Abb. 6,7 und 11) ergab sich, daß die Bindung nach einem initialen Maximum rasch wieder abnimmt. Dieser Effekt ist zeit- und temperaturabhängig und scheint entweder einer Membraneigenschaft dieser Spezies oder einem Artefakt zu entsprechen als Folge der Membranpräparation. Allerdings stimmt der beschriebene zeitliche Verlauf der Bindungskinetik an isolierten Zellmembranen aus Ratten-Herzen mit einem initialen Gipfel gut überein mit dem zeitabhängigen Verlauf der Zunahme der Kontraktionskraft perfundierter Ratten-Herzen durch g-Strophanthin (Fricke et al., 1975), so daß ein möglicher Zusammenhang doch bestehen kann. Es konnte ausgeschlossen werden, daß g-Strophanthin selbst den Rezeptor verändert (Abb. 12) oder daß die Änderung der Affinität des Rezeptors gegenüber g-Strophanthin durch die Aktivität proteolytischer Enzyme im Inkubationsmedium bedingt ist (Abb. 16). Trotzdem liegt es nahe, eine durch die Membranpräparation bedingte Schädigung bzw. Eigenschaftsänderung der Zellmembranen anzunehmen (Erdmann et al., 1976b), da eine derartige von selbst einsetzende Disso-

ziation des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes an intakten Zellmembranen nicht beobachtet wurde und sich ergeben hat, daß auch die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität während der Inkubation rasch abnimmt (Abb. 14 und 15).

Von mehreren Arbeitsgruppen sind temperaturabhängige Effekte von Detergenzien und Lipasen (Phospholipase A und C) auf die ATPase-Aktivität isolierter Zellmembranen beschrieben worden (Charnock et al., 1971; Kimelberg und Papahadjopoulos, 1972; Taniguchi und Iida, 1972; Taniguchi und Iida, 1973; Stahl, 1973; Grisham und Barnett, 1973; Charnock et al., 1973; Charnock et al., 1975; Ayala et al., 1976; Miller und Woodhouse, 1977; Charnock et al., 1977). Der anhand von ATPase-Aktivitätskurven bei einer kritischen Temperatur ausgewiesene "point of inflection" mit einem scharfen Knick in der Arrhenius-Auftragung der ATPase-Aktivität wird gedeutet als Folge von temperaturabhängigen Phasenverschiebungen innerhalb der Lipid-Doppelschicht der Membran. Es ist möglich, daß solche temperaturabhängigen Änderungen des Fließgleichgewichtes der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten zwischen gelartigem und flüssigem Zustand innerhalb der Lipid-Doppelschicht der Membran nicht nur das enzymatisch aktive Zentrum der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase betreffen sondern auch über Konformationsänderungen der Membran die Herzglykosidbindungsstelle. Aufgrund der hier gezeigten Versuche an Meer-schweinchen-Hirn-, Ratten-Hirn- und Ratten-Skelettmuskel-Membranen kann diese Vermutung wegen experimenteller Schwierigkeiten (die ^3H -g-Strophanthin-Bindung bei 3°C exakt zu messen) und des Fehlens von weiteren Meßpunkten im Temperaturbereich von 10 bis 15°C letztlich nicht bewiesen werden (Abb. 35 und 38). Für diese Annahme (daß auch die Herzglykosidbindungsstelle von solchen temperaturabhängigen Phasenverschiebungen betroffen ist) spricht allerdings, daß an Ratten-Skelettmuskel-Membranen zweifelsfrei eine lineare Temperaturabhängigkeit der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten und damit auch der Affinitätskonstanten ($K_A = 1/K_D$) des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes ermittelt werden konnte (Abb. 30). Aus den Arbeiten von Taniguchi und Iida (1973) und Charnock et al. (1977) ergibt sich übereinstimmend, daß nach Vorbehandlung der Membranfraktion mit

Detergenzien (z.B. Desoxicholat) oder Phospholipasen eine temperaturabhängige Phasenverschiebung nicht mehr beobachtet wird, woraus ein linearer Arrhenius-plot resultiert (also kein Knick). Das scheint auch hier zuzutreffen, da unsere Skelettmuskelmembranen mit Hilfe von 0.33% Desoxicholat präpariert worden sind. Hirnmembranen hingegen wurden ohne Zusatz von Desoxicholat isoliert; insofern könnte der in den Abb. 35 und 38 angedeutete Knick in der Arrhenius-Auftragung mit einer kritischen Temperatur von etwa 20°C ("point of inflection") in Übereinstimmung mit der Literatur darauf hindeuten, daß es sich hier doch um ein allgemeines Membranphänomen handelt und daß durch Manipulationen während der Membranpräparation nicht nur das enzymatisch aktive Zentrum der ATPase (und damit die ATPase-Aktivität), sondern auch die Herzglykosidbindungsstelle beeinflusst worden sind.

Weitere Hinweise auf Konformationsänderungen der Membranen während einer Membranpräparation haben sich in unseren Versuchen auch anhand der konzentrationsabhängigen Bindungsstudien ergeben. Eine Gerade in der Scatchard-Auftragung der Bindungsdaten bedeutet (Scatchard, 1949), daß innerhalb der untersuchten Rezeptorpopulation alle Rezeptoren die gleiche Affinität gegenüber g-Strophanthin haben unabhängig von der g-Strophanthinkonzentration und daß somit nur ein einheitlicher Rezeptor vorliegt (Meerschweinchen-Niere, -Erythrocyten und -Herz und Ratten-Niere; Abb. 17, 18, 20 und 22). An Hirnmembranen von Meerschweinchen (Abb. 19) und Ratten (Abb. 23) ergaben sich in den Scatchard-Auftragungen der Bindungsdaten jedoch leicht gekrümmte Kurven, was bedeuten würde, daß sich die Affinität des Rezeptors gegenüber g-Strophanthin konzentrationsabhängig ändert oder daß möglicherweise (mindestens) zwei verschiedene Rezeptoren vorliegen. Kürzlich wurde berichtet, daß die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase aus Hirnmembranen in zwei verschiedenen Zustandsformen vorliegt (Sweadner, 1979). Auch Charnock et al. (1977) vermuteten, daß die Herzglykosidbindungsstelle in Rinder-Hirn in der Membran in mindestens zwei verschiedenen Umgebungsformen vorliegt, von denen eine gegenüber der Einwirkung von Phospholipase A resistent, die andere hingegen sehr empfindlich ist. Möglicher-

weise sind diese Befunde auch als Erklärung für die gekrümmten Scatchard-plots an Hirnmembranen von Ratte und Meerschweinchen zutreffend. Zeitabhängige Konformationsänderungen der Membranen während des Inkubierens scheinen hier im Gegensatz zu den Versuchen mit Skelettmuskel-Membranen offensichtlich nicht die Ursache zu sein, da der g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex aus Hirnmembranen mehrere Stunden lang stabil bleibt (Abb. 3 und 8).

Deutliche Hinweise auf eine Konformationsänderung der Membran während der Inkubation ergaben die Versuche an Skelettmuskel-Membranen von Meerschweinchen (Abb. 21) und Ratte (Abb. 24). Hier wird deutlich, daß jetzt (unabhängig von der Temperatur) auch der Zeitfaktor eine Rolle spielt. Je länger man inkubiert, desto stärker ändert sich die Affinität der Herzglykosidbindungsstelle gegenüber g-Strophanthin, ohne daß dabei allerdings die Gesamtzahl der maximalen Bindungsstellen verändert würde. Anhand dieser Versuche wird außerdem deutlich, daß es sehr schwierig ist, das Äquilibrium der Bindung zu bestimmen. Aus der Tatsache, daß sich durch eine kürzere Inkubationszeit, in der das Bindungsmaximum noch nicht erreicht ist, eine Gerade in der Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard ergibt und daß die so errechnete Dissoziationskonstante (Ratten-Skelettmuskel-Membranen $K_D = 1.3 \times 10^{-7}$ M) gut übereinstimmt mit der an intakten kontrahierenden Skelettmuskelstreifen gefundenen Dissoziationskonstante (Musculus soleus $K_D = 3.8 \times 10^{-7}$ M, Abb. 56; und Clausen und Hansen, 1977, $K_D = 1.5 \times 10^{-7}$ M) folgt eher, daß der Herzglykosid-Rezeptor in Skelettmuskelmembranen nur in einer einheitlichen Form vorliegt und daß die gekrümmten Kurven zeitabhängige Artefakte darstellen. Offensichtlich spielen neben den Phasenverschiebungen innerhalb der Lipidmatrix der Membran (siehe oben) auch noch andere davon unabhängige Konformationsänderungen der Membran eine Rolle. Das wird auch an Ratten-Herzmuskel-Membranen deutlich.

An Ratten-Herzmuskel-Membranen (Abb. 25) wurden zwei verschiedene Bindungsstellen für g-Strophanthin gefunden. Ein hoch-affiner Rezeptor mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 1.1 \times 10^{-7}$ M und niedriger Bindungskapazität von nur etwa 10% der Gesamtbindung und ein niederaffiner Rezeptor mit einer

$K_D' = 2.8 \times 10^{-5}$ M und hoher Bindungskapazität (90% der Gesamtbindung). Durch die Scatchard-Auftragung der Bindungsdaten allein kann nicht geklärt werden, ob die niederaffine Bindungsstelle ein Artefakt ist (Erdmann et al., 1976b), ein zweiter unabhängiger Rezeptor (Taniguchi und Iida, 1972b; Okita, 1977) oder Ausdruck einer negativen Cooperativität innerhalb einer einheitlichen Rezeptorpopulation (de Meyts und Roth, 1975; Levitzky, 1974; Limbird et al., 1975; Limbird und Lefkowitz, 1976). Andere Erklärungen für gekrümmte Scatchard-plots werden in letzter Zeit häufig diskutiert: mobile Rezeptoren, Konformationsänderungen der Membranen, Interaktionen unter den Molekülen eines Liganden, schrittweise Ligand-Rezeptor-Interaktionen und radioaktive Verunreinigungen (Jacobs und Cuatrecasas, 1976; Levy et al., 1976; Peters, 1977; Boeynaems, 1977; Bentfeld et al., 1977; Reimann und Soloff, 1978). Diese Erklärungen können hier aber nicht zutreffen, da durch Bindung von ^3H -g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor in schlagenden Ventrikelsstreifen der Ratte (Abb. 54) über die Scatchard-Auftragung der Bindungsdaten die Dissoziationskonstante nur eines einheitlichen Rezeptors gefunden wurde ($K_D = 3.0 \times 10^{-7}$ M), die übereinstimmt mit den Bindungsdaten des hochaffinen Rezeptorproteins in isolierten Zellmembranen ($K_D = 1.1 \times 10^{-7}$ M, Abb. 25), der Ermittlung der Dissoziationskonstanten durch den Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten ($K_D = 2.3 \times 10^{-7}$ M, Tabelle 5) und den Ergebnissen von Sharma und Banerjee (1978; $K_D = 3.2 \times 10^{-7}$ M). Außerdem wurde der halbmaximal positiv inotrope Effekt bei einer g-Strophanthin-Konzentration von $\text{ED}_{50} = 3.0 \times 10^{-7}$ M gefunden (Abb. 52, 53 und 55). Die geringe Differenz der Dissoziationskonstanten (1.1×10^{-7} M gegenüber 3.0×10^{-7} M) erklärt sich zwanglos durch das unterschiedliche Inkubationsmedium (mit und ohne Kalium). Auch eine negative Cooperativität unter den Herzglykosid-Rezeptoren konnte ausgeschlossen werden, da die Dissoziationskurve des g-Strophanthin-Rezeptorkomplexes durch Verdünnung ("dilution-experiment") und Verdrängung ("chase-experiment") einen identischen Kurvenverlauf zeigt (Abb. 39). Aufgrund des linearen Scatchard-plots der Bindung von ^3H -g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor

schlagender Ventrikelstreifen (in vivo) und des Ausschlusses einer negativen Cooperativität unter den Herzglykosid-Rezeptoren aus isolierten Zellmembranen kann ein gekrümmter Scatchard-plot an isolierten Zellmembranen (in vitro) mit einer errechneten niederaffinen Bindungsstelle von $K_D' = 2.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ wohl nur als Artefakt erklärt werden (Erdmann et al., 1976b). Dabei liegt die Möglichkeit nahe, daß die Masse der in Tabelle 1 ausgewiesenen niederaffinen Bindungsstellen geschädigte hochaffine Bindungsstellen darstellen. Diese Deutung könnte den Ergebnissen von Charnock et al. (1977) entsprechen, die nach Detergenzien-Behandlung der Membran eine Zunahme der Anzahl der Bindungsstellen gefunden haben, wobei diese zusätzlichen Bindungsstellen extrem empfindlich auf Lipidveränderungen (Lipolyse) reagieren.

Aus der in-vivo-Bindung von ^3H -g-Strophanthin an schlagende Ventrikelstreifen errechnet sich die Anzahl der Herzglykosid-Rezeptoren mit $660/\mu^2$ Zelloberfläche. Dieser Wert stimmt gut überein mit den Ergebnissen von McCall (1979), der an Zellkulturen von Ratten-Herzzellen eine Rezeptordichte von $720/\mu^2$ Zelloberfläche fand (zum Vergleich: menschliches Myokardgewebe etwa 1000 Rezeptoren/ μ^2 Zelloberfläche, Erdmann, 1978; und Katzen-Herz 760 Rezeptoren/ μ^2 Zelloberfläche, Michael et al., 1979).

Es bleibt allerdings darauf hinzuweisen, daß konzentrationsabhängige Bindungsversuche an einen Rezeptor unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt werden müssen. Aus der Abb. 7 ist aber ersichtlich, daß das Gleichgewicht der Bindung bei isolierten Membranen aus Ratten-Herzen schwer zu bestimmen ist. In unseren Untersuchungen wurde deshalb ein "apparentes" Äquilibrium zum Zeitpunkt der maximalen ^3H -g-Strophanthin-Bindung bzw. des maximalen positiv inotropen Effektes angenommen.

Durch die bisher diskutierten Versuchsergebnisse ergibt sich also, daß experimentelle Ergebnisse an isolierten Zellmembranen nur mit großer Zurückhaltung auf intakte Zellen übertragen werden dürfen. Umso nachdrücklicher kann allerdings dann auf Befunde verwiesen werden, wenn sich übereinstimmende Ergebnisse an isolierten Zellmembranen und intakten Zellen finden lassen.

Dies ist an Ratten-Skelettmuskel- und Ratten-Herz-Membranen durch die hier gezeigten Versuche in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen gelungen. Somit sind die an der als insensitiv geltenden Spezies Ratte (und sicherlich auch Meerschweinchen) nachgewiesenen Herzglykosidbindungsstellen als echte Herzglykosid-Rezeptoren zu bezeichnen, da die Bindung von g-Strophanthin an diesen Rezeptor nicht nur selektiv und zeit- und temperaturabhängig und mit relativ hoher Affinität erfolgt und reversibel ist, sondern auch die kinetischen Konstanten der spezifischen Membranbindung mit dem pharmakologischen Effekt der Zunahme der Kontraktionskraft nahezu identisch sind.

4.2. Rezeptorbindung und Hemmung der $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase

Um der Frage nachzugehen, ob die Hemmung der $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase mit der Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor korreliert und für den Eintritt des positiv inotropen Effektes notwendig ist, kann die halbmaximale Hemmkonzentration für die $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase-Aktivität mit der Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes der verschiedenen Organe verglichen werden. Dabei ist allerdings zu beachten, daß die Dissoziationskonstante K_D die freie g-Strophanthin-Konzentration angibt, bei der 50% der Herzglykosid-Rezeptoren mit g-Strophanthin besetzt sind, während bei der halbmaximalen Hemmkonzentration der $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase die Gesamtkonzentration (also das gebundene und das freie g-Strophanthin) gemessen wird. Ein direkter Vergleich der Konzentrationen ist nur dann möglich, wenn der Bindung und der Hemmung die gleiche Rezeptor-Konzentration zugrundeliegt. Solche nicht vergleichbaren Rezeptorkonzentrationen sind dann möglicherweise die Erklärung für die große Streuung der von verschiedenen Arbeitsgruppen berichteten halbmaximalen Hemmkonzentrationen (siehe unten).

Die von uns ermittelten halbmaximalen Hemmkonzentrationen (Tabelle 6, Abb. 41-48) stimmen innerhalb einer experimentellen Fehlerbreite gut überein mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Repke et al., 1965; Dransfeld et al., 1966; Borsch-

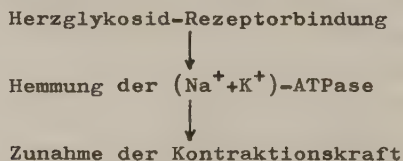
Galetke et al., 1972; Godfraind, 1975).

Die unter identischen Bedingungen gemessene Rezeptorbindung und Hemmung der ATPase bei Ratten-Herzmembranen (Abb. 50 und 51) ergab, daß hier keine Korrelation besteht zwischen Bindung und Hemmung. Bei einer g-Strophanthin-Konzentration von etwa 10^{-7} M waren bereits 50% der Herzglykosidrezeptoren mit g-Strophanthin besetzt, eine Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase konnte jedoch noch nicht gemessen werden. Erst bei etwa 4×10^{-5} M g-Strophanthin wurde die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase halbmaximal gehemmt. Dieser Wert stimmt gut überein mit den Ergebnissen von Dransfeld et al. (1966; $I_{50} = 5 \times 10^{-5}$ M) und Repke et al. (1965; $I_{50} = 5.9 \times 10^{-5}$ M); im gleichen Größenordnungsbereich liegen auch die von Allen und Schwartz (1969; $I_{50} = 10^{-4}$ M), Akera et al. (1972; $I_{50} = 1.5 \times 10^{-4}$ M) und Inturrisi und Papaconstantinou (1974; $I_{50} = 1.2 \times 10^{-4}$ M) ermittelten g-Strophanthin-Konzentrationen.

Um zu untersuchen, ob eine Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor eine Hemmung der ATPase von gleichem Ausmaß bedingt, müßte man in vivo nach erfolgter Bindung des Herzglykosids die ATPase messen können. Es ist aber sicherlich nicht ausreichend, einfach einem Tier ein Herzglykosid zu applizieren, darunter die Zunahme der Kontraktionskraft aufzuzeichnen und dann aus dem Herzgewebe die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase zu isolieren und zu messen. Während der langdauernden Membranpräparation (Homogenisierung, Zentrifugationen, Waschvorgänge zur Eliminierung von Anionen und Kationen usw.) würde das ursprünglich gebundene Herzglykosid gänzlich oder zumindest teilweise wieder abdissoziieren. Außerdem könnte der Herzglykosidrezeptor nach der Isolierung andere Eigenschaften besitzen als im physiologischen Zell- und Membranverband, so daß die Affinität und Bindungskapazität verändert sein könnte (Erdmann et al., 1976b). Trotzdem wurde versucht, an intakten Herzmuskelmembranen (in vivo) unter g-Strophanthin die Zunahme der Kontraktionskraft zu messen und dann durch anschließende Membranpräparation die "gleichzeitige" Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität der jeweiligen Zellmembranen zu bestimmen. An Kaninchen-Herzen konnte so unter g-Strophanthin eine Zunahme der Kontraktionskraft und

eine gleichzeitige Hemmung der ATPase gemessen werden; an Hunde-Herzen jedoch war trotz Zunahme der Kontraktionskraft keine Enzymhemmung nachweisbar (Huang et al., 1979). Eine sichere Aussage über die Verhältnisse in intakten schlagenden Herzmuskelzellen ist so offensichtlich nicht möglich.

Eine Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase muß aber in einer Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transportes meßbar werden (Skou, 1973). In Anlehnung an die Methode von Yamamoto et al. (1979) haben wir daher den $^{86}\text{Rb}^+$ -Transport durch die intakte Zellmembran schlagender Ventrikelstreifen unter dem Einfluß von g-Strophanthin gemessen (Abb. 57 und 58). Dabei zeigt sich, daß der $^{86}\text{Rb}^+$ -Transport als indirekter Parameter der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität erst bei einer g-Strophanthin-Konzentration von 3×10^{-5} M halbmaximal gehemmt wird. Dieses Ergebnis stimmt wiederum überein mit der halbmaximalen Hemmkonzentration der Aktivität der isolierten $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase ($I_{50} = 4 \times 10^{-5}$ M). Die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen ($K_D = 1.1 \times 10^{-7}$ M) und schlagende Ventrikelstreifen ($K_D = 3.0 \times 10^{-7}$ M) korreliert hingegen mit der Zunahme der Kontraktionskraft ($ED_{50} = 3 \times 10^{-7}$ M). Die postulierte enge Korrelation zwischen der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Hemmung und der Zunahme der Kontraktionskraft durch Herzglykoside bedeutet nicht, daß die Hemmung der ATPase ursächlich die Zunahme der Kontraktionskraft bewirkt. Die von vielen Arbeitsgruppen aufgestellte Hypothese



(Schwartz et al., 1975; Erdmann, 1978; Michael et al., 1979; Huang et al., 1979) wird kritisch beurteilt werden müssen, kann deshalb trotzdem nicht als widerlegt betrachtet werden. Einmal korreliert die Zahl der Herzglykosidrezeptoren direkt mit der Zahl der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküle (Kyte, 1972; Lane et al., 1973; Hokin, 1974; Hopkins et al., 1976) und in einem 1:1-Verhältnis

mit den Nukleotidbindungsstellen des Enzyms (Erdmann et al., 1976a), zum anderen ist unter identischen Versuchsbedingungen an menschlichem Myokardgewebe und Rinder-Herz- und Rinder-Hirn-Membranen eine völlige Übereinstimmung zwischen ^3H -g-Strophanthin-Bindung und Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität nachgewiesen worden (Erdmann und Schoner, 1974; Erdmann et al., 1976a). Der hier erhobene herausfallende Befund, daß eine Membran, die ein Herzglykosidmolekül gebunden hat, noch keine Hemmung der ATPase-Aktivität zeigt, legt die Deutung nahe, daß das Herzglykosidmolekül bei relativ digitalisresistenten Spezies vielleicht in Interaktion mit dem ATPase-Molekül tritt, aber ohne das enzymatisch aktive Zentrum der ATPase zu verändern und so die Aktivität zu hemmen, gleichzeitig aber positiv inotrop wirkt.

Eine ähnliche Deutung des Wirkungsmechanismus der Herzglykoside ist von Lüllmann und Peters (1973) vorgeschlagen worden. Sie nehmen an, daß das ATPase-Molekül von einem Herzglykosidmolekül nicht gehemmt, sondern in seiner Konformation verändert wird; diese Konformationsänderung soll wiederum zu einer Konformationsänderung der Membran führen mit konsekutiver Freisetzung von Kalzium-Ionen. Über die Struktur der ATPase und die räumliche Integration des Herzglykosid-Rezeptors in dieses Makromolekül ist aber noch zu wenig bekannt. In der Quartärstruktur des ATPase-Moleküls wird es sicherlich Unterschiede von Spezies zu Spezies geben und wahrscheinlich auch innerhalb einer Spezies von Organ zu Organ. Unterschiede in der Membranzusammensetzung sind dann Spezifika der verschiedenen Spezies und erklären dann zwanglos das unterschiedliche Verhalten des Herzglykosid-Rezeptors gegenüber g-Strophanthin hinsichtlich der Affinität und der ATPase gegenüber der Hemmung der Aktivität.

4.3. Erklärungen für die relative Insensitivität der Ratte und des Meerschweinchens gegenüber Herzglykosiden

Anhand der verschiedenen Dissoziationskonstanten des *g*-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes aus den einzelnen Organen der untersuchten Spezies Ratte und Meerschweinchen konnte gezeigt werden, daß im Vergleich zu menschlichem Myokardgewebe (Erdmann und Hasse, 1975) Ratte und Meerschweinchen um den Faktor 100 weniger empfindlich sind gegenüber *g*-Strophanthin. Nur an Hirnmembranen konnte jeweils eine etwas höhere Affinität gemessen werden (Meerschweinchen-Hirn $K_D \approx 2.6 \times 10^{-8}$ M und Ratten-Hirn $K_D \approx 3.0 \times 10^{-8}$ M).

Die etwa um 35% niedrigere Rezeptorendichte (660 Rezeptoren/ μ^2 Zelloberfläche) an Rattenherzen im Vergleich mit menschlichem Myokardgewebe mit 1000 Rezeptoren/ μ^2 (Erdmann, 1977) ist keine ausreichende Erklärung, dafür ist der prozentuale Unterschied wohl viel zu gering.

Tobin und Brody (1972) und Akera et al. (1973) erklärten die Insensitivität der Ratte durch eine rasche Dissoziation des *g*-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes. Diese Auffassung könnte bei oberflächlicher Betrachtungsweise auch zutreffend sein in Anbetracht des Verlaufes der zeitabhängigen Bindungskurve von ^3H -*g*-Strophanthin an Ratten-Herzmembranen (Abb. 7) und der sehr raschen Dissoziation des *g*-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes (Abb. 39), aus der sich ergibt, daß innerhalb von 5 min bereits mehr als 70% des ursprünglich gebundenen ^3H -*g*-Strophanthins wieder abdissoziiert sind. Im Vergleich mit menschlichem Herzmuskelgewebe ($k_{-1} = 3 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$; Erdmann, 1978) ist die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante bei Ratten-Herzen um den Faktor 100 schneller ($k_{-1} = 1 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$), während die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten gemessen unter identischen Versuchsbedingungen im gleichen Größenordnungsbereich liegen (Tabelle 5). Durch den Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten ($K_D = k_{-1}/k_{+1}$) ergäbe sich bei einer um den Faktor 100 schnelleren Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten eine höhere Dissoziationskonstante der Bindung, gleichbedeutend mit einer um den Faktor 100 verminderten Affinität des Rezeptors

gegenüber g-Strophanthin. Diese Deutung vermag dann allerdings nicht zu erklären, warum dann nicht auch der positiv inotrope Effekt ebenso rasch abnimmt, sondern über längere Zeit konstant bleibt, nachdem die Kontraktionskraft ein initiales Maximum durchlaufen hatte (Abb. 52; Fricke et al., 1975).

Eine Abdissoziation des g-Strophanthins von seinem Rezeptor ist sicherlich möglich. Folgt man aber der von Lüllmann und Peters (1973) vertretenen Auffassung, daß der Interaktion des Herzglykosidmoleküls mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase über eine Konformationsänderung der ATPase selbst dann eine Konformationsänderung der Membran folgt (die dann über weitere noch unbekannte Folgeschritte zur Freisetzung von Ca^{++} -Ionen führt), so ist zwar vorstellbar, daß die Konformationsänderung der Membran länger anhält als die Konformationsänderung der ATPase und daß eine gesteigerte Kontraktionskraft so lange anhält wie die Konformationsänderung der Membran bestehen bleibt, eine Erklärung für die Insensitivität der Ratte ist damit aber noch nicht gegeben. Diese Deutung eines stufenweisen Ablaufes von Effekten unter g-Strophanthin ist nicht überzeugend, da der positiv inotrope Effekt von g-Strophanthin zu jeder Zeit sofort aufhört, sobald das g-Strophanthin aus dem Inkubationsmedium und aus dem Muskel ausgewaschen wird. In der Kette der Ereignisse, die vom Rezeptorenbesatz durch g-Strophanthin zum positiv inotropen Effekt führen, muß es sich bei Berücksichtigung dieser Ergebnisse um eine alles-oder-nichts-Beziehung handeln.

Aus der Übereinstimmung der Konzentrationen für die spezifische halbmaximale Bindung von ^3H -g-Strophanthin an schlagende Ventrikelstreifen und die Zunahme der Kontraktionskraft unter identischen Versuchsbedingungen kann als Erklärung für die relative Digitalisresistenz der Ratte (und auch des Meerschweinchens) nur die um den Faktor 100 niedrigere Affinität des Herzglykosidrezeptors gegenüber dem Herzglykosid g-Strophanthin angesehen werden.

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, daß nach den vorliegenden Untersuchungen in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen an anderen Tierspezies (Brody, 1974; Ku et al., 1974; Gelbart und Goldman, 1977; Michael et al., 1979; Akera et al., 1979) eine spezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an schlagende Herzmuskulatur auch bei der Ratte direkt mit dem Ausmaß der Kontraktionskraft korreliert. Damit ist bewiesen, daß die Herzglykosidbindungsstelle auch im Myokard der Ratte dem für den positiv inotropen Effekt verantwortlichen Herzglykosidrezeptor entspricht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl Herzglykoside seit über 200 Jahren mit großem Erfolg zur Behandlung der Herzinsuffizienz verwendet werden, ist der Mechanismus ihrer Wirkung noch immer unklar und weitgehend umstritten. Als gesichert gilt, daß als erster Schritt in der Kette der Ereignisse, die letztlich zum positiv inotropen Effekt führen, die Bindung des Herzglykosidmoleküls an einen spezifischen Herzglykosid-Rezeptor erfolgt.

Als Herzglykosid-Rezeptor wurde ein die ganze Herzmuskelzellmembran durchspannendes Proteinmolekül nachgewiesen, das auf der Membranaußenseite das Herzglykosidmolekül mit hoher Spezifität und Selektivität bindet und auf der Membraninnenseite zur Energiegewinnung für den aktiven Ionentransport ATP zu spalten vermag, wobei zwischen Glykosidbindungskapazität und Nukleotidbindungskapazität der Membran ein 1:1-Verhältnis besteht. Diese Ergebnisse führten zu der Auffassung, daß der Herzglykosid-Rezeptor mit der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase zumindest eng verknüpft wenn nicht sogar identisch ist, da nach erfolgter Membranbindung die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität und konsekutiv auch der transmembranöse aktive Na^+ / K^+ -Transport spezifisch gehemmt werden.

Spezifische Herzglykosid-Rezeptoren wurden bei vielen Spezies nachgewiesen. Ratten und Meerschweinchen hingegen gelten als relativ unempfindlich gegenüber Herzglykosiden, da bei diesen Spezies um den Faktor 100 bis 1000 höhere Konzentrationen von Herzglykosiden erforderlich sind, um am Herzmuskel jeweils einen positiv inotropen Effekt zu erzielen. Als Ursache für diese Insensitivität wurde vermutet, daß - falls diese beiden Spezies überhaupt spezifische Herzglykosid-Rezeptoren haben - die Bindung eines Herzglykosids an den Herzglykosid-Rezeptor mit (im Vergleich zu den hochempfindlichen Spezies) entsprechend niedrigerer Affinität erfolgt.

Die hier gezeigten Versuche hatten zum Ziel, auch an Ratten und Meerschweinchen solche spezifischen Herzglykosid-Rezeptoren nachzuweisen und zu quantifizieren, ihre Eigenschaften zu

untersuchen, ihre Verknüpfung mit dem $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-System einerseits und die Korrelation zwischen Rezeptorbindung und Zunahme der Kontraktionskraft andererseits zu überprüfen.

5.1. Spezifische Bindung von Herzglykosiden

An isolierten Zellmembranen aus Herz, Hirn, Niere, Skelettmuskulatur und Erythrocyten von Ratten und Meerschweinchen konnte (mit Ausnahme der Ratten-Erythrocyten) eine spezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin nachgewiesen werden. Diese spezifische Bindung beträgt in der Regel mehr als 95% des gesamten gebundenen ^3H -g-Strophanthins (Ratten-Nierenmembranen 75-85%, Meerschweinchen-Erythrocyten 40%), sie ist zeit- und temperaturabhängig, folgt einer Sättigungskinetik und ist reversibel. An mehreren Organen wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Bildung und der Dissoziation des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes sowie thermodynamische Konstanten in Abhängigkeit von der Temperatur ermittelt. Die aus den beiden Geschwindigkeitskonstanten jeweils berechnete Dissoziationskonstante stimmt gut überein mit der unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelten Dissoziationskonstante des jeweiligen g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes.

Es ergaben sich deutliche kinetische Hinweise darauf, daß die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor isolierter Zellmembranen zeit- und temperaturabhängigen Konformationsänderungen der Membran unterliegt. Dabei scheint es sich nicht nur um rein inkubationsbedingte Artefakte zu handeln, sondern eher um ein allgemeines Membranphänomen, das durch temperaturabhängige Phasenverschiebungen innerhalb der Lipidmatrix der Membran zustandekommt.

5.2. Herzglykosidbindung und Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase

Über die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor isolierter Zellmembranen wurden die Dissoziationskonstanten des jeweiligen g-Strophanthin-

Rezeptor-Komplexes unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt. Sie liegen im Bereich von 10^{-7} M, also um den Faktor 100 höher als an menschlichem Myokardgewebe und bedeuten eine etwa um den Faktor 100 niedrigere Affinität des Herzglykosid-Rezeptors aus Ratten- und Meerschweinchen-Gewebe zum g-Strophanthin.

Lediglich an Hirnmembranen beider Spezies wurde eine K_D im Bereich von 10^{-8} M gefunden. Dieser Befund erklärt die bekannte größere zentralnervöse als kardiale Empfindlichkeit der Ratte gegenüber Herzglykosiden. An Ratten-Nierenmembranen liegt die Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-5} M.

In den Scatchard-Auftragungen der jeweiligen Bindungsdaten ergibt sich kein einheitlicher Kurvenverlauf. An Hirn- und Skelettmuskelmembranen beider Spezies und an Ratten-Herzmembranen ergeben sich Hinweise für verschiedene Herzglykosid-Rezeptor-Typen. Es ist wahrscheinlich, daß an der Membran durch Konformationsänderungen während der Membranpräparation oder während der Inkubation unterschiedliche Veränderungen entstehen und die Bindung beeinflussen. Aber auch andere Erklärungen sind möglich, so z.B. die Existenz von mindestens zwei voneinander unabhängigen Rezeptoren oder eine negative Cooperativität unter den Rezeptoren innerhalb einer einzigen Rezeptorpopulation eines Organes.

An isolierten Ratten-Herzmembranen wurden aus den Bindungsdaten mit Hilfe eines Computerprogramms die Dissoziationskonstanten von mindestens zwei voneinander unabhängigen Rezeptoren errechnet, ein hochaffiner Rezeptor mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 1.1 \times 10^{-7}$ M und ein niederaffiner Rezeptor mit einer K_D im Bereich von 10^{-5} M. Eine negative Cooperativität der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung konnte durch kinetische Messungen ausgeschlossen werden.

Zusätzlich zu den Dissoziationskonstanten der verschiedenen g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexe wurden die jeweiligen halbmaximalen Hemmkonzentrationen der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität ermittelt. Bei Ratten-Herzmembranen ergab sich, daß die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor nicht mit einer gleichzeitigen Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-aktivierbaren ATPase}$ gekoppelt ist. Die gesamte Bindungskapazität des hochaffinen

Rezeptors ist bereits bei einer g-Strophanthin-Konzentration kleiner als 10^{-6} M vollständig abgesättigt. Eine Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität ist bei dieser Konzentration aber praktisch noch nicht meßbar, erst bei 4×10^{-5} M g-Strophanthin ist die ATPase-Aktivität halbmaximal gehemmt.

5.3. Herzglykosidbindung und pharmakologische Effekte

Den Versuchen an isolierten Zellmembranen wurden gegenübergestellt die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor in schlagenden Ventrikelstreifen.

Aus den zeit- und konzentrationsabhängigen Verlaufskurven des Effektes von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft schlagender Ventrikelstreifen wurde über eine Konzentrations-Wirkungskurve die halbmaximale Zunahme der Kontraktionskraft bei einer g-Strophanthin-Konzentration von 3×10^{-7} M ermittelt. Unter identischen Versuchsbedingungen wurde an schlagenden Ventrikelstreifen (in vivo) auch die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin gemessen und daraus die Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes mit einer $K_D = 3 \times 10^{-7}$ M errechnet. Dieser Wert ist identisch mit der g-Strophanthin-Konzentration für den halbmaximalen positiv inotropen Effekt und stimmt ebenfalls gut überein mit den Bindungsdaten des hochaffinen Rezeptors an isolierten Zellmembranen (Dissoziationskonstante $K_D = 1.1 \times 10^{-7}$ M).

Eine Übereinstimmung zwischen den Dissoziationskonstanten fand sich auch an isolierten Ratten-Skelettmuskelmembranen ($K_D = 1.3 \times 10^{-7}$ M) und schlagenden Muskelstreifen aus dem Musculus soleus der Ratte ($K_D = 3.8 \times 10^{-7}$ M).

In beiden in-vivo-Versuchen ergaben sich die Bindungsdaten nur einer einheitlichen Rezeptorpopulation, so daß der an isolierten Zellmembranen nachgewiesene niederaffine Rezeptor mit einer Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-5} M wahrscheinlich entweder einen präparations- oder inkubationsbedingten Artefakt darstellt oder aber mit dem positiv inotropen Effekt nicht gekoppelt ist.

Unter identischen Versuchsbedingungen wurde über die Hemmung der transmembranösen $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme elektrisch gereizt schlagen-der Ventrikelstreifen der Effekt von g-Strophanthin auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbare ATPase gemessen. Dabei zeigt sich, daß die transmembranöse $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in intakten Zellen erst bei einer g-Strophanthin-Konzentration von 4×10^{-5} M halbmaximal gehemmt wird.

Die Gegenüberstellung der erhobenen Befunde an isolierten Ratten-Herzmembranen und schlagenden Ventrikelstreifen macht deutlich, daß bei der Ratte der positiv inotrope Effekt nicht mit einer gleichzeitigen Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase bzw. des $^{86}\text{Rb}^+$ -Transportes gekoppelt ist. Somit wird durch die vorgelegten Untersuchungen die Hypothese der kausalen Verknüpfung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Hemmung mit dem positiv inotropen Effekt der Herzglykoside zumindest für das Ratten-Herz und wahrscheinlich auch für das Meerschweinchen-Herz widerlegt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AKERA, T.: Membrane adenosinetriphosphatase: a digitalis receptor? *Science* 198, 569-574 (1977)
2. AKERA, T., HOOK, J.B., TOBIN, T. and BRODY, T.M.: Cardiac glycoside sensitivity of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-activated ATPase in new-born rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 4, 699-706 (1972)
3. AKERA, T., BASKIN, S.I., TOBIN, T., BRODY, T.M.: Ouabain: temporal relationship between the inotropic effect and the in vitro binding to, and dissociation from ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-activated ATPase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 277, 151-162 (1973)
4. AKERA, T., BENNETT, R.T., OLGAARD, M.K., BRODY, T.M.: Cardiac Na^+, K^+ -adenosine triphosphatase inhibition by ouabain and myocardial sodium: a computer simulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199, 287-297 (1976)
5. AKERA, T., BRODY, T.M.: The role of Na^+, K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol. Rev.* 29, 187-220 (1978)
6. AKERA, T., YAMAMOTO, S., CHUBB, J., McNISH, R. and BRODY, T.M.: Biochemical basis for the low sensitivity of the rat heart to digitalis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 308, 81-88 (1979)
7. ALBERS, R.W., KOVAL, G.J., SIEGEL, G.J.: Studies on the interaction of ouabain and other cardio-active steroids with sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. *Mol. Pharmacol.* 4, 324-336 (1968)
8. ALLEN, J.C., SCHWARTZ, A.: A possible biochemical explanation for the insensitivity of the rat to cardiac glycosides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 168, 42-46 (1969)
9. AYALA, J., NIETO, M., CARREIRA, J. and MUNOZ, E.: Activation parameters of the adenosine triphosphatase of micrococcus lysodeikticus. A comparison of the soluble and membrane-bound forms of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 66, 43-47 (1976)

10. BAKER, P.F., MANIL, J.: The rates of action of K^+ and ouabain on the sodium pump in squid axons. *Biochim. Biophys. Acta* 150, 328-330 (1968)
11. BAKER, P.F., WILLIS, J.S.: Potassium ions and the binding of cardiac glycosides to mammalian cells. *Nature* 226, 521-523 (1970)
12. BARNETT, R.E.: Effect of monovalent cations on the ouabain inhibition of the sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 9, 4644-4648 (1970)
13. BARTELS, H.-J., HESCH, R.-D.: Homotrope kooperative Effekte und aufsteigende B/F-Kurven bei Hormon-Antikörperreaktionen. *Klin. Biochem.* 11, 311-318 (1973)
14. BENTFELD, M., LÜLLMANN, H., PETERS, T. and PROPPE, D.: Interdependence of ion transport and the action of ouabain in the heart muscle. *Br. J. Pharmac.* 61, 19-27 (1977)
15. BESCH, H.R., ALLEN, J.C., GLICK, G., SCHWARTZ, A.: Correlation between the inotropic action of ouabain and its effects on subcellular enzyme systems from canine myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 171, 1-12 (1970)
16. BOEYNAEMS, J.M.: On the multiple meanings of the concept of negative cooperativity. Elsevier/North Holland Biomed. Press 49-56 (1977)
17. BOEYNAEMS, J.M., DUMONT, J.E.: Quantitative analysis of the binding of ligands to their receptors. *J. Cyc. Nucl. Res.* 1, 123-142 (1975)
18. BOEYNAEMS, J.M., DUMONT, J.E.: The two-step model of ligand-receptor interaction. *Mol. Cell. Endocrinology* 7, 33-47 (1977)
19. BORSCH-GALETKE, E., DRANSFELD, H., GREEFF, K.: Specific activity and sensitivity to strophanthin of the $Na^+ + K^+$ -activated ATPase in rats and guinea-pigs with hypoadrenalism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 274, 74-80 (1972)
20. BRODY, T.M.: Discussion paper: ouabain-induced inhibition of cardiac ($Na^+ + K^+$)-ATPase and the positive inotropic response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 242, 684-687 (1974)

21. BRODY, T.M., AKERA, T.: Relations among Na^+ , K^+ -ATPase activity, sodium pump activity, transmembrane sodium movement, and cardiac contractility. *Fed. Proc.* 36, 2219-2224 (1977)
22. CALDWELL, P.C., KEYNES, R.D.: The effect of ouabain on the efflux of sodium from a squid axon. *J. Physiol.* 148, 8P-9P (1959)
23. CHAMNESS, G.C., McGUIRE, W.L.: Scatchard plots: common errors in correlation and interpretation. *Steroids* 26, 538-542 (1975)
24. CHANG, K.-L., JACOBS, S., CUATRECASAS, P.: Quantitative aspects of hormone-receptor interactions of high affinity. Effect of receptor concentration and measurement of dissociation constants of labeled and unlabeled hormones. *Biochim. Biophys. Acta* 406, 294-303 (1975)
25. CHARNOCK, J.S., COOK, D.A. and CASEY, R.: The role of cations and other factors on the apparent energy of activation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 323-329 (1971)
26. CHARNOCK, J.S., COOK, D.A., ALMEIDA, A.F., TO, R.: Activation energy and phospholipid requirements of membrane-bound adenosine triphosphatases. *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 393-399 (1973)
27. CHARNOCK, J.S., ALMEIDA, A.F. and TO, R.: Temperature-activity relationships of cation activation and ouabain inhibition of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 480-487 (1975)
28. CHARNOCK, J.S., SIMONSON, L.P. and ALMEIDA, A.F.: Variation in sensitivity of the cardiac glycoside receptor characteristics of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase to lipolysis and temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 465, 77-92 (1977)
29. CHOI, Y.R., AKERA, T.: Kinetics studies on the interaction between ouabain and $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 481, 648-659 (1977)
30. CLARK, A.J.: The mode of action of drugs on cells. Williams and Wilkins, Baltimore (1933)

31. CLAUSEN, T., HANSEN, O.: Ouabain binding and Na^+ - K^+ -transport in rat muscle cells and adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 345, 387-404 (1974)
32. CLAUSEN, T. and KOHN, P.G.: The effect of insulin on the transport of sodium and potassium in rat soleus muscle. *J. Physiol.* 265, 19-42 (1977)
33. CLAUSEN, T., HANSEN, O.: Active Na-K transport and the rate of ouabain binding. The effect of insulin and other stimuli on skeletal muscle and adipocytes. *J. Physiol.* 270, 415-430 (1977)
34. CUATRECASAS, P., HOLLENBERG, M.D.: Binding of insulin and other hormones to non-receptor materials: saturability, specificity and apparent "negative cooperativity". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62, 31-40 (1975)
35. DAHL, J.L., HOKIN, L.E.: The sodium-potassium adenosine-triphosphatase. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 327-356 (1974)
36. DE MEYTS, P.: Cooperative properties of hormone receptors in cell membranes. *J. Supramol. Struc.* 4, 241-258 (1976)
37. DE MEYTS, P., ROTH, J.: Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1118-1126 (1975)
38. DETWEILER, D.K.: Comparative pharmacology of cardiac glycosides. *Fed. Proc.* 26, 1119-1124 (1967)
39. DRANSFELD, H., GREEFF, K., BERGER, H., CAUTIUS, V.: Die verschiedene Empfindlichkeit der Na^+ K^+ -aktivierten ATPase des Herz- und Skelettmuskels gegen k-Strophanthin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak.* 254, 225-234 (1966)
40. ERDMANN, E.: Cell membrane receptors for cardiac glycosides in the heart. Membrangebundene Herzglykosidrezeptoren der Herzmuskelzelle. *Basic Res. Cardiol.* 72, 315-325 (1977)
41. ERDMANN, E.: Quantitative Aspekte der spezifischen Bindung von Herzglykosiden an Membranrezeptoren. *Habilitations-schrift, München* (1978)
42. ERDMANN, E.: Influence of cardiac glycosides on their receptor. *Handb. Experiment. Pharmacol.*, Springer Verlag, im Druck (1980)

43. ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 386-398 (1973)
44. ERDMANN, E., SCHONER, W.: Ouabain-receptor interactions in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 283, 335-356 (1974)
45. ERDMANN, E., HASSE, W.: Quantitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes. *J. Physiol.* 251, 671-682 (1975)
46. ERDMANN, E., PATZELT, R., SCHONER, W.: The cardiac glycoside receptor: its properties and its correlation to nucleotide binding sites, phosphointermediate, and ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity. *Recent Adv. Stud. Cardiac. Struc. Metabol.* 9, 329-335 (1976a)
47. ERDMANN, E., PHILIPP, G., TANNER, G.: Ouabain-receptor interactions in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase preparations. A contribution to the problem of nonlinear Scatchard plots. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 287-296 (1976b)
48. FRICKE, U., HOLLBORN, U., KLAUS, W.: Inotropic action, myocardial uptake and subcellular distribution of ouabain, digoxin and digitoxin in isolated rat hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 288, 195-214 (1975)
49. GELBART, A. and GOLDMAN, R.: Correlation between microsomal ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity and ^3H -ouabain binding to heart tissue homogenates. *Biochem. Biophys. Acta* 481, 689 (1977)
50. GLYNN, I.M.: Activation of adenosine triphosphatase activity in cell membrane by external potassium and internal sodium. *J. Physiol. (London)* 160, 18P (1962)
51. GLYNN, I.M.: The action of cardiac glycosides on ion movements. *Pharmacol. Rev.* 16, 381-407 (1964)
52. GLYNN, I.M., KARLISH, S.J.D.: The sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* 37, 13-55 (1975)
53. GODFRAIND, T.: Cardiac glycoside receptors in the heart. *Biochem. Pharmacol.* 24, 823-827 (1975)

54. GRISHAM, C.M. and BARNETT, R.E.: The role of lipid-phase transitions in the regulation of the (sodium + potassium) adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 12, 2635-2637 (1973)
55. GROBECKER, H., PIECHOWSKI, U. und GREEFF, K.: Die Wirkung des k-Strophanthins und Digitonins auf den Ionentransport und die Membran-ATPase der Erythrozyten von Menschen, Meerschweinchen und Ratten. *Med. Exp.* 9, 273-282 (1963)
56. HANSEN, O.: The relationship between g-strophanthin-binding capacity and ATPase-activity in plasma membrane fragments of ox brain. *Biochim. Biophys. Acta* 233, 122-132 (1971)
57. HANSEN, O., SKOU, J.C.: A study on the influence of the concentration of Mg^{2+} , Pi , K^+ , Na^+ , and tris on $(Mg^{2+} + Pi)$ -supported g-strophanthin binding to $(Na^+ + K^+)$ -activated ATPase from ox brain. *Biochim. Biophys. Acta* 311, 51-66 (1973)
58. HELLER, M. and BECK, S.: Interactions of cardiac glycosides with cells and membranes. Properties and structural aspects of two receptor sites for ouabain in erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 514, 332-347 (1978)
59. HÖMIG, J.-P.: Die Anatomie des aktiven Bewegungsapparates der Albinoratte. Institut für Histologie und Embryologie der Tiere der Universität München, Inaugural-Dissertation (1970)
60. HOKIN, L.E.: Purification and properties of the (sodium + potassium)-activated adenosinetriphosphatase and reconstitution of sodium transport. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 242, 12-23 (1974)
61. HOLLEMANS, H.J.G., BERTINA, R.M.: Scatchard plot and heterogeneity in binding affinity of labeled and unlabeled ligand. *Clin. Chem.* 21, 1769-1773 (1975)
62. HOPKINS, B.E., WAGNER, H. and SMITH, T.W.: Sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase of the nasal salt gland of the duck (*anas platyrhynchos*). *J. Biol. Chem.* 251, 4365-4371 (1976)
63. HUANG, W., RHEE, H.M., CHIU, T.H. and ASKARI, A.: Re-evaluation of the relationship between the positive inotropic effect of ouabain and its inhibitory effect on $(Na^+ + K^+)$ -

- dependent adenosine triphosphatase in rabbit and dog hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211, 571-582 (1979)
64. INTURRISI, C.E. and PAPACONSTANTINO, H.C.: Ouabain sensitivity of the Na^+, K^+ -ATPase from rat neonatal and human fetal and adult heart. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 242, 710-716 (1974)
65. JACOBS, S., CHANG, K.-J. and CUATRECASAS, P.: Estimation of hormone receptor affinity by competitive displacement of labeled ligand: effect of concentration of receptor and of labeled ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 687-692 (1975)
66. JACOBS, S. and CUATRECASAS, P.: The mobile receptor hypothesis and "cooperativity" of hormone binding. Application to insulin. *Biochim. Biophys. Acta* 433, 483-495 (1976)
67. JOINER, C.H., LAUF, P.K.: The correlation between ouabain binding and potassium pump inhibition in human and sheep erythrocytes. *J. Physiol.* 283, 155-175 (1978)
68. JOINER, C.H. and LAUF, P.K.: Temperature dependence of active K^+ transport in cation dimorphic sheep erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 552, 540-545 (1979)
69. JORGENSEN, P.L.: Isolation and characterization of the components of the sodium pump. *Q. Rev. Biophys.* 7, 239-274 (1975)
70. KAHN, R.C., FREYCHET, P. and ROTH, J.: Quantitative aspects of the insulin-receptor. Interaction in liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 249, 2249-2257 (1974)
71. KIMELBERG, H.K. and PAPAHADJOPOULOS, D.: Phospholipid requirement for $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity. *Biochem. Biophys. Acta* 282, 277 (1972)
72. KIRK, R.G.: Potassium transport and lipid composition in mammalian red blood cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 464, 157-164 (1977)
73. KU, D., AKERA, T., PEW, C.L., BRODY, T.M.: Cardiac glycosides: correlations among Na^+, K^+ -ATPase, sodium pump and contractility in the guinea pig heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 285, 185-200 (1974)

74. KYTE, J.: The titration of the cardiac glycoside binding site of the ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247, 7634-7641 (1972)
75. LANE, L.K., COPENHAVER, J.H., LINDENMAYER, G.E., SCHWARTZ, A.: Purification and characterization of and ^3H -ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney. *J. Biol. Chem.* 248, 7197-7200 (1973)
76. LANGER, G.A.: Effects of digitalis on myocardial ionic exchange. *Circulation* 46, 180-187 (1972)
77. LANGER, G.A.: Relationship between myocardial contractility and the effects of digitalis on ionic exchange. *Fed. Proc.* 36, 2231-2234 (1977)
78. LANGER, G.A.: The role of calcium in the control of myocardial contractility: an update. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12, 231-239 (1980)
79. LAUF, P.K., SHOEMAKER, D.G., JOINER, C.H.: Changes in K^+ pump transport and ouabain binding sites in erythrocytes of genetically low K^+ lambs. *Biochim. Biophys. Acta* 507, 544-548 (1978)
80. LEVITZKI, A.: Negative co-operativity in clustered receptors as a possible basis for membrane action. *J. theor. Biol.* 44, 367-372 (1974)
81. LEVY, W.B., HAYOOCK, J. W. and COTTMAN, C.W.: Membrane permeability and receptor function. *J. theor. Biol.* 60, 109-130 (1976)
82. LIMBIRD, L.E., DE MEYTS, P. and LEFKOWITZ, R.J.: β -adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 1160-1168 (1975)
83. LIMBIRD, L.E. and LEFKOWITZ, R.J.: Negative cooperativity among β -adrenergic receptors in frog erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 251, 5007-5014 (1976)
84. LEFKOWITZ, R.J.: β -adrenergic receptors: recognition and regulation. *N. Engl. J. Med.* 295, 323-328 (1976)
85. LIN, M.H., AKERA, T.: Increased ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase concentrations in various tissues of rats caused by thyroid hormone treatment. *J. Biol. Chem.* 253, 723-726 (1978)

86. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
87. LÜLLMANN, H. and PETERS, T.: Studies on the side of action of cardiac glycosides. Symposium on Digitalis, Oslo; Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, Norway, 125-131 (1973)
88. LÜLLMANN, H., PETERS, T. and RAVENS, U.: Studies on the kinetics of ^3H -ouabain uptake and exchange in the isolated papillary muscle of the guinea-pig. *Br. J. Pharmac.* 53, 99-107 (1975)
89. MATSUI, H., SCHWARTZ, A.: Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent ATPase from cardiac tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 151, 655-663 (1968)
90. MCCALL, D.: Cation exchange and glycoside binding in cultured rat heart cells. *Am. J. Physiol.* 236, C87-C95 (1979)
91. MEINERTZ, T., NAWRATH, H. and SCHOLZ, H.: Possible role of cyclic AMP in the relaxation process of mammalian heart: effects of dibutyryl cyclic AMP and theophylline on potassium contractures in cat papillary muscles. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 293, 129-137 (1976)
92. MICHAEL, L.H., SCHWARTZ, A. and WALLICK, E.T.: Nature of the transport adenosine triphosphatase-digitalis complex: XIV. Inotropy and cardiac glycoside interaction with Na^+ , K^+ -ATPase of isolated cat papillary muscles. *Mol. Pharmacol.* 16, 135-146 (1979)
93. MILLER, H.M. and WOODHOUSE, S.P.: Long chain fatty acid inhibition of sodium plus potassium - activated adenosine triphosphatase from rat heart. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 55, 741-752 (1977)
94. NAKAO, M.: Several topics concerning Na, K -ATPase. *Life Sci.* 15, 1849-1859 (1975)
95. OKITA, G.T., RICHARDSON, F., ROTH-SCHECHTER, B.F.: Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185, 1-11 (1973)
96. OKITA, G.T.: Dissociation of the positive inotropic effects from the cardiotoxic effects of digitalis. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 18, 14-19 (1975)

97. OKITA, G.T.: Dissociation of Na^+, K^+ -ATPase inhibition from digitalis inotropy. *Fed. Proc.* 36, 2225-2230 (1977)
98. PALATINI, P., DABBENI-SALA, F., PITOTTI, A., BRUNI, A. and MANDERSLOOT, J.C.: Activation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent ATPase by lipid vesicles of negative phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 466, 1-9 (1977)
99. PERRONE, J.R., HACKNEY, J.F., DIXON, J.F., HOKIN, L.E.: Molecular properties of purified (sodium + potassium)-activated adenosine triphosphatases and their subunits from the rectal gland of squalus acanthias and the electric organ of *electrophorus electricus*. *J. Biol. Chem.* 250, 4178-4184 (1975)
100. PETERS, T.: Membrane structure and drug actions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 297, 1-4 (1977)
101. REIMANN, E.M., SOLOFF, M.S.: The effect of radioactive contaminants on the estimation of binding parameters by Scatchard analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 533, 130-139 (1978)
102. REPKE, K., PORTIUS, H.J.: Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym. *Experientia* 19, 1-7 (1963)
103. REPKE, K.: Metabolism of cardiac glycosides. New aspects of cardiac glycosides. III, Houston, Pergamon Press, 47-73 (1964)
104. REPKE, K., EST, M., PORTIUS, H.J.: Über die Ursache der Speciesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit. *Biochem. Pharmacol.* 14, 1785-1802 (1965)
105. SCAF, A.H.J.: Cooperativity in classical receptor theory. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 215, 4-12 (1975)
106. SCATCHARD, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672 (1949)
107. SCHATZMANN, H.-J.: Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran. *Helv. Physiol. Acta* 11, 346-354 (1953)
108. SCHONER, W., von ILBERG, C., KRAMER, R. and SEUBERT, W.: On the mechanism of Na^+ - and K^+ -stimulated hydrolysis of adenosine triphosphatase. 1. Purification and properties

- of a Na^+ - and K^+ -activated ATPase from ox brain. Eur. J. Biochem. 1, 334-343 (1967)
109. SCHUURMANS STEKHOFEN, F.M.A.H., van HEESWIJK, M.P.E., De PONT, J.J.H.H.M. and BONTING, S.L.: Studies on $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase. 38. A 100.000 molecular weight protein as the low energy phosphorylated intermediate of the enzyme. Biochim. Biophys. Acta 422, 210-224 (1976)
 110. SCHWARTZ, A.: Is the cell membrane Na^+, K^+ -ATPase enzyme system the pharmacological receptor for digitalis? Circ. Res. 39, 2-7 (1976a)
 111. SCHWARTZ, A.: Sodium-potassium adenosine triphosphatase - a receptor for digitalis? Biochem. Pharmacol. 25, 237-239 (1976b)
 112. SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G., ALLEN, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. Pharmacol. Rev. 27, 3-134 (1975)
 113. SEN, A.K., TOBIN, T., POST, R.L.: A cycle for ouabain inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphate. J. Biol. Chem. 244, 6596-6604 (1969)
 114. SHARMA, V.K. and BANERJEE, S.P.: Specific ^3H -ouabain binding to rat heart and skeletal muscle: effects of thyroidectomy. Mol. Pharmacol. 14, 122-129 (1978)
 115. SKOU, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim. Biophys. Acta 23, 349-401 (1957)
 116. SKOU, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membranes. Physiol. Rev. 45, 596-617 (1965)
 117. SKOU, J.C.: The relationship of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated enzyme system to transport of sodium and potassium across the cell membranes. Bioenergetics 4, 1-30 (1973)
 118. STAHL, W.L.: Role of phospholipids in the Na^+, K^+ -stimulated adenosine triphosphatase system of brain microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 154, 56-67 (1973)

119. SWEADNER, K.J.: Two molecular forms of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-stimulated ATPase in brain. *J. Biol. Chem.* 254, 6060-6067 (1979)
120. TANIGUCHI, K. and IIDA, S.: The effect of phospholipids on the apparent activation energy of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 274, 536-541 (1972a)
121. TANIGUCHI, K. and IIDA, S.: Two apparently different ouabain binding sites of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 288, 98-102 (1972b)
122. TANIGUCHI, K. and IIDA, S.: The role of phospholipids in the binding of ouabain to sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *Mol. Pharmacol.* 9, 350-359 (1973)
123. TEMMA, K., AKERA, T., KU, D., BRODY, T.M.: Sodium pump inhibition by sulfhydryl inhibitors and myocardial contractility. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 302, 63-71 (1978)
124. TOBIN, T., BRODY, T.M.: Rates of dissociation of enzyme-ouabain complexes and $K_{0.5}$ values in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-adenosine triphosphatase from different species. *Biochem. Pharmacol.* 21, 1553-1560 (1972)
125. WALLICK, E.T., LANE, L.K. and SCHWARTZ, A.: Biochemical mechanism of the sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* 41, 397-411 (1979)
126. WEDER, H.G., SCHILDKNECHT, J., LUTZ, R.A. and KESSELRING, P.: Determination of binding parameters from Scatchard plots. Theoretical and practical considerations. *Eur. J. Biochem.* 42, 475-481 (1974)
127. WEIDEMANN, M.J., ERDELT, H., KLINGENBERG, M.: Adenine nucleotide translocation of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 16, 313-335 (1970)
128. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., BOZSIK, M., KRAWIETZ, W. and ERDMANN, E.: Effects of vanadate in cultured rat heart muscle cells. Vanadate transport, intracellular binding and vanadate-induced changes in beating and in active cation flux. *Biochim. Biophys. Acta* 597, 364-383 (1980)
129. WHITAM, R., CHIPPERFIELD, A.R.: Ouabain binding to the sodium pump in plasma membranes isolated from ox brain. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 563-577 (1973)

130. WHITTAM, R., CHIPPERFIELD, A.R.: The reaction mechanism of the sodium pump. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 149-171 (1975)
131. YAMAMOTO, S., AKERA, T. and BRODY, T.M.: Sodium influx rate and ouabain-sensitive rubidium uptake in isolated guinea pig atria. *Biochim. Biophys. Acta* 555, 270-284 (1979)
132. YODA, A., HOKIN, L.E.: On the reversibility of binding of cardiotonic steroids to a partially purified (Na^+ + K^+)-dependent adenosine triphosphatase from beef brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 880-886 (1970)

7. LEBENSLAUF

Geboren wurde ich am 19. September 1943 in Tetschen-Bodenbach, Sudetenland, als zweiter Sohn des Dr. jur. Fridolin Philipp und dessen Ehefrau Christine, geb. Franze.

1950 - 1954 Volksschule in Celle und Hannover/Niedersachsen

1954 - 1963 Oberrealschule in Hannover und München

1963 Reifezeugnis an der Gisela-Oberrealschule München

1963 - 1965 zweijährige Praktikantenzeit in einer Apotheke zur Vorbereitung auf das Pharmazie-Studium

1965 - 1967 Studium der Rechtswissenschaft in München und Bonn an der juristischen Fakultät

1967 - 1970 Pharmaziestudium in München und Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität München;
Approbation als Apotheker 1971

1969 heiratete ich die Apothekerassistentin Dorothea Brandner, geb. 28. Februar 1945

1970 - 1972 Tätigkeit als Apotheker in öffentlichen Apotheken
1971 Grundwehrdienst bei der Bundeswehr

1972 - 1978 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1978 Staatsexamen und Approbation

Seit 1978 arbeite ich als wissenschaftlicher Assistent an der Medizinischen Klinik I, Klinikum Großhadern, München; Direktor Professor Dr. Gerhard Riecker.

